

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092639** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.04.08

(22) Дата подачи заявки
2019.05.03

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(54) **КОМБИНАЦИИ АНТИТЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **РА 2018 00195; РА 2018 00644**

(32) **2018.05.03; 2018.09.26**

(33) **DK**

(86) **PCT/EP2019/061455**

(87) **WO 2019/211472 2019.11.07**

(71) Заявитель:
ГЕНМАБ Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:

**Де Йонг Роб, Бёрскенс Франк,
Остинди Симоне, Лабрейн Аран
Франк, Стрюмане Кристин, Схюрман
Янине, Де Крёк Барт-Ян (NL)**

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

(57) В документе представлены комбинации первого и второго антител, имеющих модифицированные эффекторные функции Fc, возникающие в результате аминокислотных замен в Fc-области, где аминокислотные замены позволяют взаимозависимую активацию эффекторных функций, таких как CDC и/или ADCC. Также предлагаются комбинации первого и второго антител, обладающих агонистической активностью или повышенной агонистической активностью, возникающих в результате аминокислотных замен в Fc-области, при этом агонистическая активность взаимозависима как от первого, так и от второго антитела.

A1

202092639

202092639

A1

КОМБИНАЦИИ АНТИТЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к антителам, имеющим модифицированные эффекторные функции Fc в результате аминокислотных замен в Fc-области, то есть таких как усиление эффекторных функций Fc или снижение эффекторных функций Fc, а также к применению таких антител в комбинации и к композициям, включающим такие антитела.

Предшествующий уровень техники

Fc-опосредованные эффекторные функции моноклональных антител, такие как комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC), антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) и антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP), вносят вклад в терапевтическое окно, определяемое эффективностью и токсичностью. CDC инициируется связыванием C1q с Fc-областями антител. C1q - мультимерный белок, состоящий из шести глобулярных связывающих головок, прикрепленных к ножке. Отдельные глобулярные связывающие головки имеют низкую аффинность к IgG; и C1q должен приобретать avidность за счет связывания нескольких молекул IgG1 на поверхности клетки, чтобы запустить классический путь комплемента. ADCC и ADCP инициируются связыванием Fc-области IgG с рецепторами Fc γ (Fc γ R) на эффекторных клетках.

Было показано, что гексамеризация IgG при связывании мишени на поверхности клетки поддерживает активное связывание с C1q. Гексамеризация опосредуется межмолекулярными нековалентными взаимодействиями Fc-Fc, а взаимодействия Fc-Fc могут быть усилены точечными мутациями в домене CH3, включая E345R и E430G.

WO2013/004842 раскрывает антитела или полипептиды, содержащие варианты Fc-области, имеющие одну или несколько модификаций аминокислот, приводящих к модифицированным эффекторным функциям, таким как комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC).

WO2014/108198 раскрывает полипептиды, такие как антитела, содержащие варианты Fc-области, имеющие одну или несколько модификаций аминокислот, приводящих к повышенной комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC).

WO2012/130831 касается полипептидов, содержащих Fc-область, у которых изменена эффекторная функция в результате одной или нескольких аминокислотных замен в Fc-области полипептида. Эти полипептиды проявляют пониженную аффинность к человеческому Fc γ RIIIa, и/или Fc γ RIIa, и/или Fc γ RI по сравнению с полипептидом,

содержащим Fc-область IgG дикого типа, и демонстрируют сниженную ADCC, индуцированную указанным полипептидом, по меньшей мере, до 20% от ADCC, индуцированной полипептидом, содержащим Fc-область IgG человека дикого типа. WO2012/130831 не раскрывает антитела, которые обладают усиленными взаимодействиями Fc-Fc и/или повышенной способностью образовывать гексамеры.

Как описано выше, предыдущие усилия по усилению взаимодействий Fc-Fc между антителами имели эффект усиления эффекторных функций, таких как усиление CDC и/или ADCC, что может привести к гибели клетки-мишени, с которой связывается антитело.

Однако, если антиген-мишень повсеместно экспрессируется в организме как на здоровых клетках, так и на клетках, вызывающих заболевание, тогда антитело может стать токсичным, убивая здоровые клетки. Следовательно, существует потребность том, чтобы сделать эффекторные функции антитела с усиленными эффекторными функциями зависимыми от другого антитела, комбинация которых является селективной в отношении вызывающих заболевание клеток, тем самым предотвращая гибель здоровых клеток.

Цели изобретения

Индивидуально действующие антитела с усиленными эффекторными функциями полагаются исключительно на антигенсвязывающую область антитела для достижения специфичности в отношении своей клетки-мишени, что может ограничивать подходящие мишени теми мишенями, которые высоко избирательно экспрессируются на пораженных клетках. Индивидуально действующие антитела с мутациями, снижающими эффекторную функцию, могут щадить здоровые клетки, экспрессирующие антиген-мишень этих антител, но их эффективность может быть ограничена мутациями, снижающими эффекторную функцию. Следовательно, существует очевидная потребность в создании комбинаций антител, из которых каждое отдельное антитело может связывать как вызывающие заболевание клетки, так и здоровые клетки, но усиленные эффекторные функции которых активируются только или предпочтительно, если оба антитела связываются с одной и той же вызывающей заболевание клеткой. Такое разделение активации эффекторной функции от связывания с индивидуальной мишенью позволяет создавать антитела, которые связывают мишени, которые до сих пор не могли быть оптимально использованы для терапии антителами из-за нежелательной токсичности для здоровых клеток или из-за недостаточной активности для болезнетворных клеток, при условии, что активация эффекторной функции является избирательной для клеток, одновременно связанных комбинациями антител.

Соответственно, целью настоящего изобретения является предоставление первого

и второго антитела, которые сконструированы для обеспечения максимальной активности в отношении клеток-мишеней, связанных с обоими антителами одновременно, при этом первое антитело не обеспечивает или обеспечивает минимальную активность в отношении клеток-мишеней, связанных только первым антителом, и где второе антитело обеспечивает минимальную или пониженную активность в отношении клеток-мишеней, связанных только вторым антителом, по сравнению с активностью в отношении клеток, связанных одновременно обоими антителами.

Еще одной целью настоящего изобретения является предоставление первого и второго антитела, содержащих как Fc-область IgG человека, так и антигенсвязывающую область, которые оба имеют замену, которая увеличивает взаимодействия Fc-Fc, замену, которая ингибирует ингибируя самоолигомеризацию, и первое антитело дополнительно имеет замену для снижения эффекторных функций, таких как CDC и/или ADCC, где первое антитело имеет пониженные эффекторные функции, такие как CDC и/или ADCC, по сравнению с первым исходным антителом без указанной замены для снижения эффекторных функций, где комбинация первого и второго антитела обладает улучшенными эффекторными функциями по сравнению с первым и вторым антителом по отдельности.

Другой целью настоящего изобретения является предоставление первого антитела, содержащего Fc-область IgG человека и антигенсвязывающую область, при этом антитело имеет замену, которая увеличивает взаимодействия Fc-Fc, замену, ингибирующую самоолигомеризацию, и замену для снижения эффекторных функций, такие как CDC и/или ADCC, по сравнению с первым исходным антителом и вторым антителом, содержащим Fc-область IgG человека и антигенсвязывающую область, причем второе антитело имеет замену, которая увеличивает взаимодействия Fc-Fc, замену, ингибирующую самоолигомеризацию и замену для усиления эффекторных функций, таких как CDC и/или ADCC, по сравнению со вторым исходным антителом, где активность первого антитела и второго антитела становятся взаимозависимыми за счет комплементарных замен, ингибирующих самоолигомеризацию.

Еще одной целью настоящего изобретения является предоставление первого антитела, содержащего Fc-область IgG человека и антигенсвязывающую область, при этом антитело имеет замену, которая увеличивает взаимодействия Fc-Fc, замену, ингибирующую самоолигомеризацию, и замену для снижения эффекторных функций, таких как CDC и/или ADCC, по сравнению с первым исходным антителом и вторым антителом, содержащим Fc-область IgG человека и антигенсвязывающую область, при этом второе антитело имеет замену, которая увеличивает взаимодействия Fc-Fc, замену,

ингибирующую самоолигомеризацию, и замену, индуцирующую агонистическую активность, такую как повышенная активация целевого рецептора при связывании, по сравнению со вторым исходным антителом, где активность первого и второго антитела становятся взаимозависимыми за счет комплементарного ингибирования самоолигомеризации замены.

Еще одной целью настоящего изобретения является предоставление первого антитела, содержащего Fc-область IgG человека и антигенсвязывающую область, при этом антитело имеет замену, которая увеличивает взаимодействия Fc-Fc, замену, ингибирующую самоолигомеризацию, и замену для снижения агонистической активности, такой как пониженная активация рецептора-мишени при связывании по сравнению с первым исходным антителом и вторым антителом, содержащим Fc-область IgG человека и область связывания антигена, причем второе антитело имеет замену, которая увеличивает взаимодействия Fc-Fc, замену, ингибирующую самоолигомеризацию, и замену для снижения агонистической активности, такой как сниженная активация рецептора-мишени при связывании по сравнению со вторым исходным антителом, где первое и второе антитело в комбинации обладают повышенной агонистической активностью, взаимозависимой от комплементарных замен, ингибирующих самоолигомеризацию.

Еще одной задачей настоящего изобретения является предоставление первого антитела, содержащего Fc-область IgG человека и антигенсвязывающую область, причем антитело имеет замену, которая усиливает взаимодействия Fc-Fc, замену, ингибирующую самоолигомеризацию, и замену, которая снижает эффекторные функции, такие как CDC и/или ADCC, по сравнению с первым исходным антителом и вторым антителом, содержащим Fc-область IgG человека и антигенсвязывающую область, причем антитело имеет замену, ингибирующую самоолигомеризацию, замену, которая увеличивает взаимодействия Fc-Fc и активирует передачу сигналов, необязательно индуцирует усиленную передачу сигналов, когда антигенсвязывающая область антитела связывается с соответствующим антигеном, по сравнению со вторым исходным антителом, где активность первого и второго антитела становится взаимозависимой от комплементарных замен, ингибирующих самоолигомеризацию.

Сущность изобретения

Как описано в данном документе, настоящее изобретение относится к комбинации первого антитела, имеющего Fc-область и область связывания антигена, где Fc-область имеет одну замену, усиливающую Fc-Fc, и одну или несколько замен, которые ослабляют эффекторные функции, такие как CDC и/или ADCC и второго антитела, имеющего Fc-

область и антигенсвязывающую область, где Fc-область имеет одну замену, усиливающую Fc-Fc, и, возможно, имеет одну или несколько замен, которые усиливают эффекторные функции Fc, такие как CDC и/или ADCC. Первое и второе антитело дополнительно содержат комплементарную замену, ингибирующую самоолигомеризацию, которая делает гетероолигомеризацию первого и второго антитела взаимозависимой.

Не ограничиваясь какой-либо теорией, считаем, что комбинация первого антитела и второго антитела по изобретению, имеющих комплементарные замены, которые обеспечивают эффекторные функции или сигнальные функции, например, делают агонистическую активность первого и второго антител взаимозависимой, способна снизить токсичность комбинации и увеличить терапевтическое окно комбинации. Кроме того, комбинация первого антитела и второго антитела по настоящему изобретению может использоваться для специфического истощения популяций клеток, которые экспрессируют антигены, распознаваемые первым антителом и вторым антителом. Таким образом, комбинация первого антитела и второго антитела по настоящему изобретению может использоваться для специфического истощения популяций опухолевых клеток, экспрессирующих первый и второй антигены, распознаваемые первым и вторым антителом, при этом не истощая популяции здоровых клеток или ткани, экспрессирующие только первый или второй антиген, распознаваемые первым и вторым антителом.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает первое антитело, содержащее первую Fc-область IgG человека и первую антигенсвязывающую область, способную связываться с первым антигеном, для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом, содержащим вторую Fc-область IgG человека и вторую антигенсвязывающую область, способную связываться со вторым антигеном, причем указанная первая Fc-область включает

a. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

b. замену K439E или S440K, при условии, что замена не является S440K, если замена в (a) представляет собой S440Y или S440W, и

c. одну замену аминокислоты в положении G237 или одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R, G236K, K322A, E269K, K322E и P329R;

а указанная вторая Fc-область включает

d. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей

из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

е. замену K439E или S440K, при условии, что замена не S440K, если замена в (d) представляет собой S440Y или S440W и

f. одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: K326A, K326W, E333A и E333S, если первая Fc-область включает замену K322E или P329R;

где первая Fc-область имеет замену K439E, а вторая Fc-область имеет замену S440K или первая Fc-область имеет замену S440K, а вторая Fc-область имеет замену K439E; где аминокислотные положения соответствуют IgG1 человека в соответствии с системой нумерации EU (Edelman et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1969 May;63(1):78-85; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. 1991 NIH Publication No. 91-3242).

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает первое антитело, содержащее первую Fc-область IgG человека и первую антигенсвязывающую область, способную связываться с первым антигеном, для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом, содержащим вторую Fc-область IgG человека и вторую антигенсвязывающую область, способную связываться со вторым антигеном, причем указанная первая Fc-область включает

a. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

b. замену K439E или S440K, при условии, что замена не является S440K, если замена в (a) представляет собой S440Y или S440W, и

c. одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из: L234, L235, G237, G236, или одну или нескольких замен, выбранных из группы, состоящей из: K322A и E269K;

а указанная вторая Fc-область включает

d. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

е. замену K439E или S440K, при условии, что замена не S440K, если замена в (d) представляет собой S440Y или S440W и

где первая Fc-область имеет замену K439E, а вторая Fc-область имеет замену S440K, или первая Fc-область имеет замену S440K, а вторая Fc-область имеет замену K439E; где положения аминокислот соответствуют IgG1 человека в соответствии с

системой нумерации EU.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает первое антитело, содержащее первую Fc-область IgG человека и первую антигенсвязывающую область, способную связываться с первым антигеном, для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом, содержащим вторую Fc-область IgG человека и вторую антигенсвязывающую область, способную связываться со вторым антигеном, причем указанная первая Fc-область включает

a. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

b. замену K439E или S440K, при условии, что замена не является S440K, если замена в (a) представляет собой S440Y или S440W, и

c. одну замену аминокислоты в положении G237 или одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R, G236K, K322A, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q и L235E;

а указанная вторая Fc-область включает

d. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

e. замену K439E или S440K, при условии, что замена не S440K, если замена в (d) представляет собой S440Y или S440W и

где первая Fc-область имеет замену K439E, а вторая Fc-область имеет замену S440K, или первая Fc-область имеет замену S440K, а вторая Fc-область имеет замену K439E; где положения аминокислот соответствуют IgG1 человека в соответствии с системой нумерации EU.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает первое антитело, содержащее первую Fc-область IgG человека и первую антигенсвязывающую область, способную связываться с первым антигеном, для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом, содержащим вторую Fc-область IgG человека и вторую антигенсвязывающую область, способную связываться со вторым антигеном, причем указанная первая Fc-область включает

a. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

b. замену K439E или S440K, при условии, что замена не является S440K, если

замена в (a) представляет собой S440Y или S440W, и

c. одну замену аминокислоты в положении P329 или замену K322E;

а указанная вторая Fc-область включает

d. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

e. замену K439E или S440K, при условии, что замена не S440K, если замена в (d) представляет собой S440Y или S440W и

f. одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: K326A, K326W, E333A и E333S;

где первая Fc-область имеет замену K439E, а вторая Fc-область имеет замену S440K или первая Fc-область имеет замену S440K, а вторая Fc-область имеет замену K439E; где положения аминокислот соответствуют IgG1 человека в соответствии с системой нумерации EU.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает первое антитело, содержащее первую Fc-область IgG человека и первую антигенсвязывающую область, способную связываться с первым антигеном, для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом, содержащим вторую Fc-область IgG человека и второй антигенсвязывающей области, способной связываться со вторым антигеном, причем указанная первая Fc-область включает

a. замену K248E и T437R, и

b. замену K439E или S440K, и

c. одну замену аминокислоты в положении G237 или P329, или одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R, G236K, K322A, K332E, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q и L235E;

а указанная вторая Fc-область включает

d. замену K248E и T437R, и

e. замену aK439E или S440K,

где первая Fc-область имеет замену K439E, а вторая Fc-область имеет замену S440K, или первая Fc-область имеет замену S440K, а вторая Fc-область имеет замену K439E; где положения аминокислот соответствуют IgG1 человека в соответствии с системой нумерации EU.

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

Замена K439E или S440K считается комплементарной заменой, ингибирующей

самоолигомеризацию, согласно настоящему изобретению. Это первое антитело, имеющее, например, K439E может не образовывать олигомеры с другим антителом, имеющим замену K439E, однако антитело, имеющее замену K439E, может образовывать олигомеры с другим антителом, имеющим замену S440K. Антитело, имеющее замену S440K, может не образовывать олигомеры с другим антителом, имеющим замену S440K.

Замена аминокислоты в положении G237 или одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R, G236K, K322A, E269K, K322E, P329R, L234A, L234F, L235A, L235Q и L235E, считаются заменой(ами) модуляции сайта связывания с C1q согласно настоящему изобретению и ослабляют эффекторные функции, такие как CDC и/или ADCC.

Одна или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: K326A, K326W, E333A и E333S, считаются заменами модуляции сайта связывания с C1q согласно настоящему изобретению и повышают эффекторные функции, такие как CDC и/или ADCC.

В одном воплощении вторая Fc-область включает замену G237A.

Замена G237A считается заменой модуляции рецептора Fc-гамма согласно настоящему изобретению и снижает связывание рецептора Fc-гамма.

Таким образом, авторы настоящего изобретения в первом аспекте изобретения обнаружили, что путем комбинирования первого антитела и второго антитела, где первое антитело имеет замену, усиливающую Fc-Fc, замену, ингибирующую самоолигомеризацию, и одну или несколько замен, которые снижают эффекторные функции, такие как CDC и/или ADCC, и второго антитела имеющего замену, усиливающую Fc-Fc, замену, ингибирующую самоолигомеризацию, и, возможно, одну или несколько замен, которые усиливают эффекторные функции, такие как CDC и/или ADCC, и где первое и второе антитело имеют комплементарные замены, ингибирующие олигомеризацию, что дает гетероолигомеризацию первого и второго антитела взаимозависимой.

Существует возможность улучшить предел безопасности между активностью эффекторной функции на больных клетках по сравнению с активностью эффекторной функции на здоровых клетках для комбинации антител по сравнению с комбинацией антител с заменами, усиливающими Fc-Fc, и заменами, ингибирующими самоолигомеризацию, но без замен, модулирующих C1q.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, содержащему Fc-область IgG человека и антигенсвязывающую область, способную связываться с антигеном, при этом указанная Fc-область включает

a. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

b. замену K439E или S440K, при условии, что замена не является S440K, если замена в (a) представляет собой S440Y или S440W, и

c. одну замену аминокислоты в положении G237 или одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R, G236K, K322A, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q и L235E.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу, содержащему Fc-область IgG человека и антигенсвязывающую область, способную связываться с антигеном, причем указанная Fc-область включает

a. замену K248E и T437R, и

b. замену K439E или S440K, и

c. одну замену аминокислоты в положении G237 или P329, или одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R, G236K, K322A,

d. K332E, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q, L235E, K326A, K326W, E333A и E333S.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает композицию, содержащую первое и второе антитело, где первое антитело включает первую антигенсвязывающую область и первую Fc-область согласно любому воплощению или аспекту, описанному в данном документе, а второе антитело включает вторую антигенсвязывающую область и вторую Fc-область согласно любому воплощению или аспекту, описанному в данном документе.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает композицию, содержащую первое и второе антитело, где первое антитело включает первую антигенсвязывающую область, способную связываться с первым антигеном, и первую Fc-область IgG человека, а второе антитело включает вторую антигенсвязывающую область, способную связываться со вторым антигеном, и вторую Fc-область IgG человека, где указанная первая Fc-область включает

a. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

b. замену K439E или S440K, при условии, что замена не является S440K, если замена в (a) представляет собой S440Y или S440W, и

c. одну замену аминокислоты в положении G237 или одну или несколько

замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R, G236K, K322A, E269K, K322E и P329R;

а указанная вторая Fc-область включает

d. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

e. замену K439E или S440K, при условии, что замена не является S440K, если замена в (d) представляет собой S440Y или S440W, и

f. одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: K326A, K326W, E333A и E333S, если первая Fc-область включает замену K322E или P329R,

где первая Fc-область имеет замену K439E, а вторая Fc-область имеет замену S440K, или первая Fc-область имеет замену S440K, а вторая Fc-область имеет замену K439E, где положения аминокислот соответствуют IgG1 человека согласно системе нумерации EU.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает композицию, содержащую первое и второе антитело, где первое антитело включает первую антигенсвязывающую область, способную связываться с первым антигеном, и первую Fc-область IgG человека, а второе антитело включает вторую антигенсвязывающую область, способную связываться со вторым антигеном, и вторую Fc-область IgG человека, где указанная первая Fc-область включает

a. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

b. замену K439E или S440K, при условии, что замена не является S440K, если замена в (a) представляет собой S440Y или S440W, и

c. одну замену аминокислоты в положении G237 или одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R, G236K, K322A, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q и L235E;

а указанная вторая Fc-область включает

d. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

e. замену K439E или S440K при условии, что замена не является S440K, если замена в (d) представляет собой S440Y или S440W,

где первая Fc-область имеет замену K439E, а вторая Fc-область имеет замену

S440K, или первая Fc-область имеет замену S440K, а вторая Fc-область имеет замену K439E, где положения аминокислот соответствуют IgG1 человека согласно системе нумерации EU.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает композицию, содержащую первое и второе антитело, где первое антитело включает первую антигенсвязывающую область, способную связываться с первым антигеном, и первую Fc-область IgG человека, а второе антитело включает вторую антигенсвязывающую область, способную связываться со вторым антигеном, и вторую Fc-область IgG человека, где указанная первая Fc-область включает

a. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

b. замену K439E или S440K, при условии, что замена не является S440K, если замена в (a) представляет собой S440Y или S440W, и

c. одну замену аминокислоты в положении P329 или замену K322E;

а указанная вторая Fc-область включает

d. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

e. замену K439E или S440K, при условии, что замена не является S440K, если замена в (d) представляет собой S440Y или S440W, и

f. одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: K326A, K326W, E333A и E333S,

где первая Fc-область имеет замену K439E, а вторая Fc-область имеет замену S440K, или первая Fc-область имеет замену S440K, а вторая Fc-область имеет замену K439E, где положения аминокислот соответствуют IgG1 человека согласно Eu система нумерации.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей первое и второе антитело, где первое антитело включает первую антигенсвязывающую область, способную связываться с первым антигеном, и первую Fc-область IgG человека, и второе антитело включает вторую антигенсвязывающую область, способную связываться со вторым антигеном, и вторую Fc-область IgG человека, причем указанная первая Fc-область включает

a. замену K248E и T437R, и

b. замену K439E или S440K, и

с. одну замену аминокислоты в положении G237 или P329, или одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R, G236K, K322A, K332E, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q и L235E;

а указанная вторая Fc-область включает

d. замену K248E и T437R, и

e. одну замена K439E или S440K,

где первая Fc-область имеет замену K439E, а вторая Fc-область имеет замену S440K, или первая Fc-область имеет замену S440K, а вторая Fc-область имеет замену K439E; где положения аминокислот соответствуют IgG1 человека в соответствии с системой нумерации EU.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу истощения популяции клеток, экспрессирующих первый антиген и второй антиген, который включает контакт указанной популяции клеток с первым и вторым антителом или композицией в соответствии с любым первым и вторым антителом или композицией, как определено в данном документе.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего заболеванием, включающему введение указанному индивидууму эффективного количества первого и второго антитела согласно пунктам формулы изобретения, как описано в данном документе, или эффективного количества композиции, как описано в данном документе.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к набору, содержащему первый контейнер, содержащий первое антитело, как определено в данном документе, и второй контейнер, содержащий второе антитело, как определено в данном документе.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к первому и второму антителу или композиции, как описано в настоящем документе, для применения при лечении рака, аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания или инфекционного заболевания.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего заболеванием, включающему введение указанному индивидууму эффективного количества первого и второго антитела или композиции, как описано в данном документе.

Эти и другие аспекты изобретения, предпочтительно различные применения и терапевтические применения первого и второго антитела, более подробно описаны ниже.

Краткое описание чертежей

На Фигуре 1 показана селективность активности CDC для смешанных антительных

вариантов анти-IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K при введении мутации P329R. Клетки Wien 133 инкубировали с серией концентраций антител и концентраций в присутствии 20% объединенной нормальной сыворотки человека (NHS). Эффективность CDC представлена как (A) процент лизиса, определяемый процентным содержанием пропидий-йодид (PI)-положительных клеток, и (B) площадь под кривыми доза-ответ-реакция (AUC), нормированные на несвязывающее контрольное антитело IgG1-b12 (0%) и смесь IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 2 показана селективность активности CDC для смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K при введении мутации K322E. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как (A) процент лизиса, определяемый процентом PI-положительных клеток, и (B) AUC, нормализованная к несвязывающемуся контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 3 показана избирательность активности CDC при введении мутации K322E в смешанные антительные варианты анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + анти-CD20-11B8-E430G-S440K в различных клеточных линиях. Анализы CDC *in vitro* проводили с 30 мкг/мл антител в присутствии 20% NHS с использованием клеточных линий лимфомы Беркитта Wien 133 (A), Daudi (B), Raji (C) и Ramos (D), острой лимфобластной лимфомы (ALL) клеточной линии REH (E), клеточной линии миеломы U266B1 (F) и клеточной линии В-клеточной лимфомы U-698-M (G). Активность CDC представлена как процент лизиса, определяемый процентом PI-положительных клеток, нормализованных к клеточной линии к несвязывающим контрольным антителам IgG1-b12 (0%) и IgG1-CAMPATH-1H-E430G (100%) для REH, U266B1, и Wien 133 или IgG1-11B8-E430G (100%) для Daudi, Raji, Ramos и U-698-M.

На Фигуре 4 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q (G236R, K322A, E269K, K322E или P329R) + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для смеси несвязывающихся контрольных антител IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 5 показана селективность активности CDC для смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-

S440K с мутацией, усиливающей связывание с C1q (E333S, K326W или K326A/E333A). Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для смеси несвязывающихся контрольных антител IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 6 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R (A), K322A (B), E269K (C), K322E (D) или P329R (E) + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией, усиливающей связывание с C1q (E333S, K326W или K326A/E333A). Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для смеси несвязывающихся контрольных антител IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 7 показано связывание антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A (A, B), и антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией E333S (C, D), усиливающей связывание с C1q, с линиями клеток лимфомы человека Wien 133 (A, C) и Raji (B, D). Связывание антител тестировали с помощью проточной цитометрии. Связывание выражали как среднее геометрическое значение интенсивности флуоресценции (MFI). В качестве отрицательного контроля для связывания использовали образец без первичного антитела или несвязывающего анти-gp120 антитела IgG1-b12.

На Фигуре 8 показана ADCC-способность антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A, (A, C) и антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией, усиливающей связывание с C1q, E333S (B, D). (A, B) Был проведен репортерный биоанализ ADCC, в котором клетки-мишени Raji совместно инкубировали с серией разведений антител и человеческими Т-клетками Jurkat, стабильно экспрессирующими высокоаффинный FcγRIIIa (V158) и респонсивный элемент NFAT, управляющий экспрессией люциферазы светлячка. Продуцирование люциферазы количественно оценивали по люминесценции. (C, D) Был проведен анализ ADCC in vitro Europium TDA (EuTDA), в котором клетки-мишени Wien 133 совместно инкубировали с серией разведений антител и РВМС человека (Е: Т 100:1). Лизис клеток определяли путем

измерения сигнала флуоресцентного хелата EuTDA в надосадочной жидкости.

На Фигуре 9 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов, Fc-Fc-взаимодействие усиливало анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A, + варианты Fc-Fc-взаимодействия усиливали анти-CD20 IgG1-11B8- S440K с или без мутации, усиливающей связывание с C1q, E333S. Тестируемые мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, представляли собой E430G, E345K, E345R и E345R-E430G. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и максимального лизиса. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 10 показана селективность активности CDC при использовании смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутациями, модулирующими связывание с C1q, в положении G236 (G236R или G236K) или положении G237 (G237A, G237T, G237Q или G237R), или двойной мутации G237A-K322A + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с или без мутации, модулирующей связывание с C1q, E333S, E333A, K326A, K326W-E333S, G237A или G237A-E333S. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и максимального лизиса. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 11 показана селективность активности CDC для вариантов изотипа смешанных антител (IgG1, IgG2, IgG3 и стабилизированный шарниром IgG4) анти-CD52 CAMPATH-1H-E430G-K439E с или без мутации ингибирования связывания с C1q G236R + анти-CD20 11B8-E430G-S440K, с или без мутации, усиливающей связывание с C1q, E333S. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 12 показана селективность активности CDC при использовании смешанных антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с или без мутации ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A, + анти-CD37 IgG1-CD37-37.3-

E430G-S440K с или без мутации E333S, усиливающей связывание с C1q, на (A) клетках Daudi и (B) клетках Wien 133. Клетки-мишени инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-CD37-37.3-E430G (100%).

На Фигуре 13 показана DR5-опосредованная цитотоксичность (A) вариантов отдельного антитела или (B) смеси агонистов антительных вариантов анти-DR5 IgG1-DR5-01-G56T-E430G-K439E с или без мутации ингибирования связывания с C1q G236R + IgG1-DR5-05-E430G-S440K с или без мутации E333S, усиливающей связывание с C1q, на клетках рака поджелудочной железы человека ВхРС-3. Проводили трехдневный анализ жизнеспособности, при этом жизнеспособность клеток определяли с использованием набора CellTiter-Glo.

На Фигуре 14 показана активность CDC антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G с мутацией, модулирующей связывание с C1q, G237A, G236R, A327K, K322E или P329R. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12-S440K (0%; не показано) и IgG1-CAMPATH-1H-E430G (100%).

На Фигуре 15 показано связывание антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A (A, B, C), и антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией, усиливающей связывание с C1q, E333S (D, E, F) с FcRn человека. FcRn ELISA выполняли с 5 мкг/мл рекомбинантного внеклеточного домена FcRn человека (FcRnhsECDHis-B2M-BIO), нанесенного в виде покрытия, и серии разведений антител. Количество связанных антител определяли с помощью конъюгированного с HRP козьего антитела против IgG1 человека и хемилюминесцентного субстрата ABTS. Поглощение измеряли при 405 нм.

На Фигуре 16 показана скорость клиренса 500 мкг внутривенно введенного антитела у мышей SCID. (AC) Общий IgG человека в образцах плазмы определяли с помощью ELISA и наносили на график зависимости концентрации от времени для (A) вариантов IgG1-CAMPATH-1H, (B) вариантов IgG1-11B8 и (C) комбинаций вариантов IgG1-CAMPATH-1H + вариантов IgG1-11B8. Каждая точка данных представляет собой среднее +/- стандартное отклонение трех образцов. (D) Клиренс до 21 дня после введения

антитела определяли по формуле $D \cdot 1000 / AUC$ с D , введенной дозой и AUC , площадью под кривой кривой зависимости концентрации от времени.

На Фигуре 17 показано связывание иммобилизованных вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутациями ингибирования связывания с C1q G236R или G237T и вариантов IgG1-11B8-E430G-S440K с мутациями K326A или E333S, усиливающими связывание с C1q, с димерным His-меченным биотинилированным ECD из Fc γ RIIA аллотипа 131H (A), Fc γ RIIA аллотипа 131R (B), Fc γ RIIB (C), Fc γ RIIA аллотипа 158V (D) и Fc γ RIIA аллотипа 158F (E), протестированных в анализах ELISA. Связывание представлено для образцов антител с концентрацией 20 мкг/мл относительно контроля без антител (фон) и связывания с IgG1-11B8-E430G-S440K (100%). Детекцию проводили с использованием Стрептавидин-полиHRP и ABTS.

На Фигуре 18 показана селективность активности CDC при использовании смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с или без мутации, ингибирующей связывание с C1q (G236R или G237T) + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией G237A, ингибирующей связывание с Fc γ R, с или без мутации E333S, усиливающей связывание с C1q. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и как лизис при 40 мкг/мл IgG. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 19 показана избирательная активность комбинаций вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в цельной крови, определенная анализом клеток крови с помощью проточной цитометрии. Оси Y: фракция В-клеток (CD19-положительные/CD3-отрицательные) или фракция Т-клеток (CD19-отрицательные/CD3-положительные) от общей популяции лимфоцитов (CD66b-отрицательные) после инкубации в присутствии эффекторных клеток. Ось X: разные группы обработки. Символы представляют клетки от пяти разных здоровых доноров, протестированных в двух отдельных инкубациях для каждого донора. (A) Селективная активность IgG1-CAMPATH-1H-G236R-E430G-K439E, смешанного с IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. (B) Селективная активность вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, содержащих дополнительную мутацию G237, в смеси с IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. (C) Селективная активность вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, содержащих дополнительную мутацию G236R или G237, смешанных с IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K, содержащим дополнительную мутацию E333S, усиливающую связывание с C1q. (D) Степень истощения В-клеток различными

целевыми антителами для В-клеток по сравнению с взаимозависимыми комбинациями антител IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с дополнительными мутациями G236R, G237Q или G237R, смешанными с IgG1-11B8-G237A -E430G-S440K. Ось Y: представление в логарифмической шкале фракции В-клеток, определенной, как указано выше.

На Фигуре 20 показана селективность активности CDC на разных линиях клеток с разными уровнями экспрессии CD20 и CD52 за счет комбинации антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E и IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией, ингибирующей связывание с C1q в анти-CD52 компоненте и мутацией, усиливающей связывание с C1q в анти-CD20 компоненте. Анализы CDC *in vitro* проводили с 0,01-40 мкг/мл антитела в присутствии 20% NHS с использованием клеточных линий лимфомы Беркитта Daudi (A), Raji (B) и Ramos (C), линии клеток ALL REH (D) и клеточной линии В-клеточной лимфомы U-698-M (E). Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и как максимальный лизис. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 21 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов анти-CD37 IgG1-CD37-37.3-E430G-K439E с или без мутации G236R, ингибирующей связывание с C1q, + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с или без мутации E333S, усиливающей связывание с C1q. (A) Клетки Daudi и (B) клетки WIL2-S инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и как лизис при 40 мкг/мл IgG. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CD37-37.3-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 22 показано (A) связывание антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H с мутациями E430G или E345R, усиливающими взаимодействие Fc:Fc, мутацией K439E, ингибирующей самоолигомеризацию, в комбинации с любой из мутаций ингибиторования связывания Fc γ R и модуляции связывания с C1q, G236R, G237A или G237T, с клеточной линией лимфомы человека Wien 133. Связывание антител тестировали с помощью проточной цитометрии и представляли нормализованными относительно значения V_{max} IgG1-Campath-1H дикого типа (100%). В качестве отрицательного контроля для связывания использовали несвязывающее анти-gp120 антитело IgG1-b12. (B) Максимальное связывание (V_{max}) с клетками Raji антительных вариантов IgG1-Campath-1H с мутациями E430G и K439E, в комбинации с любой из

мутаций, модулирующих связывание с C1q, G236R, G237A или G237T, показано нормализованным относительно связывания IgG1-Campath-1H дикого типа (C) Кажущиеся значения Kd антительных вариантов IgG1-Campath-1H с мутациями E430G и S440K в сочетании с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, G236R, G237A или G237T, связывающихся с клетками Raji.

На Фигуре 23 показано связывание антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8 с мутацией E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, мутацией S440K, ингибирующей самоолигомеризацию, в комбинации с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, K326A или E333A (A) или E333S, G237A или G237A-E333S (B) к линии клеток лимфомы человека Raji. Связывание антител тестировали с помощью проточной цитометрии и представляли нормализованными значениями Vmax IgG1-11B8 дикого типа (100%). В качестве отрицательного контроля для связывания использовали несвязывающее анти-gp120 антитело IgG1-b12. (C, D) Максимальное связывание (Vmax) с клетками Raji антительными вариантами IgG1-11B8 с мутациями E430G и S440K, в сочетании с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, K326A или E333A (C) или E333S, G237A или G237A-E333S (D) показан нормализованным относительно связывания IgG1-11B8 дикого типа (E, F). Кажущиеся значения Kd антительных вариантов IgG1-11B8 с мутациями E430G и S440K в сочетании с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, K326A или E333A (E) или связывание E333S, G237A или G237A-E333S (F) с клетками Raji.

На Фигуре 24 показано связывание FcRn антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и анти-CD20 IgG1-11B8. (A, C) Связывание с FcRn человека показано для вариантов анти-CD52 антитела IgG1-CAMPATH-1H с мутацией E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, мутацией K439E, ингибирующей самоолигомеризацию, и мутациями, модулирующими связывание с C1q, G237A или G237T, с использованием концентрации антител 40 мкг/мл при (A) pH 6,0 или (C) pH 7,4. (B, D) Связывание с FcRn человека вариантами анти-CD20-антитела IgG1-11B8 с мутацией E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, мутацией S440K, ингибирующей самоолигомеризацию, и мутациями, модулирующими связывание с C1q, K326A, E333A, G237A или G237A-E333S, с использованием концентрации антител 40 мкг/мл при (B) pH 6,0 или (D) pH 7,4. FcRn ELISA выполняли с 2 мкг/мл покрытого рекомбинантным внеклеточным доменом FcRn человека (FcRnECDHis-B2M-BIO) и серии разведений антител. Количество связанных антител определяли с помощью конъюгированного с HRP козьего антитела против IgG1 человека и хемилюминесцентного субстрата ABTS. Поглощение измеряли при 405 нм.

На Фигуре 25 показаны концентрации общего IgG человека (hIgG), измеренные в

образцах крови, взятых у мышей, которым инъецировали антительные варианты анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H или анти-IgG1-11B8 или их смеси. (A) Общая концентрация hIgG в образцах крови, собранных у мышей, которым инъецировали IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q или IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R дикого типа. (B) Общая концентрация hIgG в образцах крови, собранных у мышей, которым вводили IgG1-11B8 дикого типа, IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A или IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S. (C) Общая концентрация hIgG в образцах крови, собранных у мышей, которым инъецировали смеси IgG1-CAMPATH-1H дикого типа + IgG1-11B8 или смеси антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8, несущих мутации, как в (A) и (B). На всех фигурах пунктирная линия представляет прогнозируемую концентрацию IgG1 во времени для антител IgG1 дикого типа у мышей SCID. (D) Клиренс до 21 дня после введения антитела определяли по формуле $D*1000/AUC$ с D, введенной дозой и AUC, площадью под кривой зависимости концентрации от времени.

На Фигуре 26 показана концентрация C4d (в мкг/мл), обнаруженная в образцах, инкубированных с антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-11B8 и IgG1-b12, несущими мутации E430G, K439E или S440K и G236R, G237A, G237Q или G237R, после вычитания средней концентрации C4d, обнаруженной в образцах отрицательного контроля, не содержащих антител. Положительные контрольные образцы включают антительные варианты, несущие мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc E345R, E430G и S440Y (RGY).

На Фигуре 27 показано связывание с C1q с клетками Wien 133, инкубируемыми на льду с нормальной сывороткой человека в качестве источника комплемента, после опсонизации антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-11B8 и IgG1-b12, несущих мутации E430G, K439E или S440K и G236R, G237T, K326A или E333S, детектируемое с помощью проточной цитометрии. Средние значения интенсивности флуоресценции были нормализованы к контрольным реакциям без антител (0%) и верхнему уровню смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%), оцененного путем подбора логарифмической модели ответа агониста. (A) Связывание C1q контрольных реакций. (B-D) Связывание C1q (B) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E, (C) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E-G236R и (D) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E-G237R, смешанных с несвязывающим контролем IgG1-b12 или различными вариантами IgG1-11B8.

На Фигуре 28 показано связывание FcγR антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H-E430G и IgG1-11B8-E430G, несущих мутацию K439E или S440K, ингибирующую самоолигомеризацию, и мутации, модулирующие связывание с C1q. (A-E)

Связывание вариантов иммобилизованных антител с димерными His-меченными биотинилированными ECD, как было протестировано в анализах ELISA, (A) высокоаффинного аллотипа FcγRIIA 131H, (B) низкоаффинного аллотипа FcγRIIA 131R, (C) FcγRIIB, (D) высокоаффинного аллотипа FcγRIIIA 158V или (E) низкоаффинного аллотипа FcγRIIIA 158F. (F) Связывание иммобилизованного FcγRIa с вариантами антител, протестированными в ELISA. Связывание представлено для образцов антител с концентрацией 20 мкг/мл и было нормализовано для каждого эксперимента после вычитания сигналов в лунках, инкубированных без первичного антитела, относительно усредненного сигнала, наблюдаемого для IgG1-CAMPATH-1H дикого типа (100%). Детекцию проводили с использованием Стрептавидин-полиHRP и ABTS.

На Фигуре 29 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H, анти-CD20 IgG1-11B8 и анти-CD52 IgG1-h2E8 путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулировать связывание с C1q. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC измерялась в трех независимых экспериментах и представлена как (A) усредненная AUC, нормализованная к несвязывающемуся контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%) и (B) средний процент лизиса, определенный по положительности в анализе с пропидиум йодидом при концентрации антитела 40 мкг/мл.

На Фигуре 30 (A, B) показана эффективность CDC отдельного агента и комбинированных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G, анти-CD20 IgG1-11B8-E430G и неантигенсвязывающих антител IgG1-b12-E430G, несущих собственные мутации, ингибирующие олигомеризацию, и мутации, модулирующие связывание с C1q, как указано. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как AUC, нормализованная к несвязывающему контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 31 показана активация линий репортерных клеток Jurkat, стабильно экспрессирующих либо (A) FcγRIIa, либо (B) FcγRIIIa, при измерении по уровню люминесценции (RLU) при совместном культивировании с клетками лимфомы Raji и различными концентрациями антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8. Значения люминесценции были нормализованы для каждого эксперимента относительно тех, которые наблюдались для IgG1-b12 (0%) и IgG1-Campath-1H дикого типа + IgG1-11B8 дикого типа (100%), перед усреднением по трем (FcγRIIa) или двум (FcγRIIIa)

экспериментальным повторам.

На Фигуре 32 показана взаимозависимая CDC на клетках Wien 133, индуцированный смесями антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8, несущих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q в неэквимолярных соотношениях. (А) Козависимая CDC, индуцированная смесями, содержащими эквимолярные и неэквимолярные отношения концентраций IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R и IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A. (В) Козависимая CDC, индуцированная смесями, содержащими эквимолярные и неэквимолярные отношения концентраций IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q и IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A.

На Фигуре 33 показана селективность активности CDC с помощью смесей антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H с вариантами анти-HLA-DR IgG1-HLA-DR-huL243 (А) или вариантами анти-HLA-DR IgG1-HLA-DR-1D09C3 (В) путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и ингибируют связывание с C1q. Клетки Oci-Ly17 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как AUC, нормализованная к несвязывающемуся контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси (А) IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-HLA-DR-huL243-E430G (100%) или (В) IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-HLA-DR-1D09C3-E430G (100%).

На Фигуре 34 показана селективная взаимозависимая активность CDC смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и анти-CD20 IgG1-11B8 путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и ингибируют связывание с C1q. Эффективность CDC показана для вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с любой из мутаций L234A, L234A-L235A, L234F, L234F-L235E, L235A, L235Q, G236R или G237Q и смесей этих вариантов с несвязывающим контрольным антителом IgG1-b12 или IgG1-11B8-E430G-S440K. Эффективность CDC представлена как AUC, нормализованная к несвязывающему контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 35 показана селективная взаимозависимая активность CDC смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и анти-CD20 IgG1-11B8 путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и ингибируют связывание с C1q. (А) Эффективность CDC антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в виде отдельных агентов или их смесей, несущих мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, E430G, E430N, E430T,

E430V, E430Y, E345A, E345K, E345Q, E345R или E345Y, мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, и мутации, ингибирующие связывание с C1q, G236R или G237A. (B) Эффективность CDC антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в виде отдельных агентов или их смесей, несущих мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345Q, E345V или E345Y, мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, и мутации, ингибирующие связывание с C1q, G236R или G237A. (C) Эффективность CDC антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в виде отдельных агентов или их смесей, содержащих соответствующие мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345Q, E345V или E345Y, мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, и мутации, ингибирующие связывание с C1q, G236R или G237A. (D) Эффективность CDC антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в виде отдельных агентов или их смесей, несущих мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, E430G или K248E-T437R, мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, и мутации, ингибирующие связывание с C1q, G236R, G237A или E333S. Эффективность CDC представлена как AUC, нормализованная к несвязывающему контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 36 показан взаимозависимая CDC на клетках лимфомы Raji, индуцированный смесями антительных вариантов IgG1-CD37-37-3 и IgG1-11B8, несущих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q. (A) Относительные площади под кривой (AUC), нормализованные к минимальному лизису (0% с IgG1-b12) и максимальному лизису (100% со смесью IgG1-CD37-37-3-E430G + IgG1-11B8 -E430G) лизиса клеток, индуцированного указанными антительными вариантами в разведении или их смесями. (B) Максимальный процент лизиса, индуцированного указанными антительными вариантами и их смесями.

На Фигуре 37 показана селективная взаимозависимая активность CDC смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и анти-CD20 IgG1-11B8 путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q. Образцы CLL пациентов инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как процент жизнеспособных В-клеток при инкубации с вариантами антител. Показаны результаты с использованием образцов CLL от пациентов 1 (A), 2 (B) и 3 (C).

На Фигуре 38 показана фракция В-клеток, CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток, обнаруженная с помощью проточной цитометрии после инкубации образцов цельной крови со смесями антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-huCLB-T3/4 и IgG1-CD5-INSERM, несущих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q. Процент (А) В-клеток, (В) CD4+ Т-клеток и (С) CD8+ Т-клеток, обнаруженных в образцах цельной крови 4 доноров после инкубации с указанными антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-huCLB-T3/4 и IgG1-b12. Процент (D) В-клеток, (E) CD4+ Т-клеток и (F) CD8+ Т-клеток, обнаруженных в образцах цельной крови 4 доноров после инкубации с указанными антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-CD5-INSERM и IgG1-b12. Фракции рассчитывали как $[100\% \times (\text{количество клеток в образце} / \text{количество клеток в «образце без антител»}) \times (\text{количество гранулоцитов в «образце без антител»} / \text{количество гранулоцитов в образце})]$.

На Фигуре 39 показана совместная активация запрограммированной гибели раковых клеток с помощью антительных вариантов против DR4 и DR5, содержащих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и ингибируют (G237T) или усиливают (K326W-E333S) связывание с C1q. (А) Жизнеспособность клеток рака поджелудочной железы человека ВхРС-3 после 72-часовой инкубации с указанными вариантами антител. (В) Жизнеспособность клеток рака толстой кишки человека COLO 205 после 72-часовой инкубации с указанными вариантами антител. Процент жизнеспособных клеток рассчитывали по следующей формуле: % жизнеспособных клеток = $[(\text{люминесценция образца антитела} - \text{люминесценция образца стауроспорина}) / (\text{люминесценция образца без антител} - \text{люминесценция образца стауроспорина})] * 100$.

Подробное описание изобретения

При описании воплощений изобретения для ясности будет использоваться конкретная терминология. Однако изобретение не предназначено для ограничения выбранными таким образом конкретными терминами, и понятно, что каждый конкретный термин включает все технические эквиваленты, которые действуют аналогичным образом для достижения аналогичной цели.

Определения

Термин «исходное антитело» следует понимать как антитело, которое идентично антителу согласно изобретению, но в котором исходное антитело не имеет замены, модулирующей связывание с C1q, согласно настоящему изобретению. Таким образом, исходное антитело может иметь замену, усиливающую Fc-Fc, и замену, ингибирующую

самоолигомеризацию. Термин «замена, модулирующая связывание с C1q» следует понимать как замену, которая может ингибировать связывание с C1q, такую как одну замену аминокислоты в положении G237 или одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R, G236K, K322A, E269K, K322E и P329R или замена, которая может усиливать связывание с C1q, такая как одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: K326A, K326W, E333A и E333S.

Термин «полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина и связывающую область» относится в контексте настоящего изобретения к полипептиду, который содержит Fc-область иммуноглобулина и связывающую область, которая способна связываться с любой молекулой, например, полипептидом, например, присутствующим на клетке, бактерии или вирионе. Fc-область иммуноглобулина определяется как фрагмент антитела, который обычно образуется после гидролиза антитела папаином (который известен специалистам в данной области), который включает две области CH2-CH3 иммуноглобулина и соединительной области, например, шарнирной области. Константный домен тяжелой цепи антитела определяет изотип антитела, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD или IgE. Fc-область опосредует эффекторные функции антител с рецепторами клеточной поверхности, называемыми Fc-рецепторами, и белками системы комплемента. Область связывания может представлять собой полипептидную последовательность, такую как белок, лиганд белка, рецептор, антиген-связывающая область или лиганд-связывающая область, способную связываться с клеткой, бактерией или вирионом. Если область связывания, например, рецептор, «полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина и область связывания», может быть получен как гибридный белок Fc-области иммуноглобулина и указанной области связывания. Если связывающая область является антигенсвязывающей областью, «полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина и связывающую область» может быть антителом, таким как химерное, гуманизованное или человеческое антитело, или антитело, содержащее только тяжелую цепь, или ScFv- Fc-гибрид. Полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина и область связывания, обычно может включать соединительную область, например, шарнирная область и две области CH2-CH3 тяжелой цепи иммуноглобулина, таким образом, «полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина и область связывания» может быть «полипептидом, содержащим, по меньшей мере, Fc-область иммуноглобулина и область связывания». Термин «Fc-область иммуноглобулина» означает в контексте настоящего изобретения, что присутствуют соединяющая область, например, шарнир в зависимости от подтипа антитела, и области CH2 и CH3 иммуноглобулина, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgGA2, IgM

или IgE человека. Полипептид не ограничивается человеческим происхождением, а может быть любого происхождения, как например, из мыши или из макаки. Термин «Fc-область дикого типа» означает в контексте настоящего изобретения Fc-область иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая встречается в природе.

Используемый в данном документе термин «шарнирная область» предназначен для обозначения шарнирной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Таким образом, например, шарнирная область человеческого антитела IgG1 соответствует аминокислотам 216-230 согласно нумерации EU.

Термин «область CH2» или «домен CH2» в контексте настоящего описания предназначен для обозначения области CH2 тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, участок CH2 антитела IgG1 человека соответствует аминокислотам 231–340 согласно нумерации EU. Однако область CH2 также может представлять собой любую из других подтипов, как описано в данном документе.

Термин «область CH3» или «домен CH3», используемый в данном документе, предназначен для обозначения области CH3 тяжелой цепи иммуноглобулина. Таким образом, например, участок CH3 антитела IgG1 человека соответствует аминокислотам 341-447 согласно нумерации EU. Однако CH3-область также может представлять собой любую из других подтипов, как описано в данном документе.

Термин «иммуноглобулин» относится к классу структурно родственных гликопротеинов, состоящих из двух пар полипептидных цепей, одной пары легких (L) низкомолекулярных цепей и одной пары тяжелых (H) цепей, все четыре потенциально связаны между собой дисульфидными связями. Структура иммуноглобулинов хорошо охарактеризована. См., например, *Fundamental Immunology Ch. 7* (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Вкратце, каждая тяжелая цепь обычно состоит из вариабельной области тяжелой цепи (обозначенной в данном документе как VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи обычно состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Тяжелые цепи связаны между собой посредством дисульфидных связей в так называемой «шарнирной области». Каждая легкая цепь обычно состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно обозначенную в данном документе как VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи обычно состоит из одного домена, CL. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности (или гипервариабельные области, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или форме структурно определяемых петель), также их называют областями, отвечающими за комплементарность связывания (CDR), перемежаясь участками, которые являются более консервативными, называемыми

каркасными областями (FR). Каждая VH и VL обычно состоит из трех CDR и четырех FR, располагающихся от N-конца к С-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (см., также Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)). Если иное не указано или не противоречит контексту, последовательности CDR в данном документе идентифицируются в соответствии с правилами IMGT с использованием DomainGapAlign (Lefranc MP., Nucleic Acids Research 1999; 27: 209-212 и Ehrenmann F., Kaas Q. and Lefranc M.-P. Nucleic Acids Res., 38, D301-307 (2010); см. также [http-адрес](http://www.imgt.org/) в Интернете www.imgt.org/. Если иное не указано или не противоречит контексту, ссылки на положения аминокислот в Fc-области/домене Fc в настоящем изобретении соответствуют нумерации EU (Edelman et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1969 May;63(1):78-85; Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - 1991 NIH Publication No. 91-3242).

Термин «антитело» (Ab) в контексте настоящего изобретения относится к молекуле иммуноглобулина, фрагменту молекулы иммуноглобулина или производному любого из них, которые обладают способностью специфически связываться с антигеном. Антитело по настоящему изобретению содержит Fc-домен иммуноглобулина и антиген-связывающую область. Антитело, как правило, содержит две области CH2-CH3 и область соединения, например, шарнирную область, например, по меньшей мере, Fc-домен. Таким образом, антитело по настоящему изобретению может содержать Fc-область и антиген-связывающую область. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей молекулы иммуноглобулина содержат домен связывания, который взаимодействует с антигеном. Константные или «Fc»-области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (такие как, эффекторные клетки) и компоненты системы комплемента, такие как C1q, первый компонент классического пути активации системы комплемента. Антитело также может представлять собой полиспецифичное антитело, такое как биспецифичное антитело или подобную молекулу. Термин «биспецифичное антитело» относится к антителу, обладающему специфичностями к, по меньшей мере, двум различным, обычно не перекрывающимся эпитопам. Такие эпитопы могут быть на одной и той же или на различных мишенях. Если эпитопы находятся на различных мишенях, то такие мишени могут находиться на одной и той же клетке или на различных клетках или на различных типах клеток. Как указано выше, до тех пор, пока не установлено иное или не продиктовано очевидно контекстом, термин антитело включает в данном документе фрагменты антитела, которые содержат, по меньшей мере, часть Fc-области и которые сохраняют способность к специфичному связыванию с антигеном. Такие фрагменты

могут быть получены с помощью любого известного метода, такого как ферментативное расщепление, пептидный синтез и метод рекомбинантной экспрессии. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может быть осуществлена с помощью фрагментов полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «Ab» или «антитело», включают, без ограничения указанным, моновалентные антитела (описанные в WO2007059782 Genmab); антитела, содержащие только тяжелые цепи, состоящие только из двух тяжелых цепей и встречающиеся в природе, например, у верблюдовых (например, Hamers-Casterman (1993) Nature 363: 446); ThioMab (Roche, WO2011069104), сконструированный домен с обменом цепей (SEED или Seed-body), которые представляют собой асимметричные и биспецифические молекулы, подобные антителам (Merck, WO2007110205); Triomab (Pharma/Fresenius Biotech, Lindhofer et al. 1995 J Immunol 155: 219; WO2002020039); Fc Δ Adp (Regeneron, WO2010151792), Azymetric Scaffold (Zymeworks/Merck, WO2012/058768), mAb-Fv (Xencor, WO2011/028952), Xmab (Xencor), иммуноглобулин с двумя вариабельными доменами (Abbott, DVD-Ig, пат. США № 7 612 181); Двухдоменные антитела с двойной головкой (Unilever; Sanofi Aventis, WO20100226923), ди-диатела (ImClone/Eli Lilly), форматы антител типа «выступ-во-впадину» (Genentech, WO9850431); DuoBody (Genmab, WO 2011/131746); Биспецифические IgG1 и IgG2 (Pfizer/Rinat, WO11143545), DuetMab (MedImmune, US2014/0348839), форматы электростатических управляющих антител (Amgen, EP1870459 и WO 2009089004; Chugai, US201000155133; Oncomed, WO2010); биспецифические IgG1 и IgG2 (Rinat Neurosciences Corporation, WO11143545), CrossMAbs (Roche, WO2011117329), LUZ-Y (Genentech), биклонические (Merus, WO2013157953), антитела с двойным целевым доменом (GSK/Domantis) или антитела два в одном Fabs двойного действия, распознающие две мишени (Genentech, NovImmune, Adimab), перекрестно-сшитые Mab (онкологический центр Karmanos), ковалентно слитые mAb (AIMM), CovX-body (CovX/Pfizer), FynomAbs (Covagen/Janssen ilag), DutaMab (Dutalys/Roche), iMab (MedImmune), IgG-подобные биспецифические (ImClone/Eli Lilly, Shen, J., et al. J Immunol Methods, 2007. 318(1-2): p. 65-74), TIG-тело, DIG-тело и PIG-тело (Pharmabcine), перенацеливаемые молекулы с двойной аффинностью (Fc-DART или Ig-DART, от MacroGenics, WO/2008/157379, WO/2010/080538), BEAT (Glenmark), Zybodies (Zyngenia), подходы с общей легкой цепью (Crucell/Merus, US7262028) или обычными тяжелыми цепями (к λ Bodies от NovImmune, WO2012023053), а также гибридные белки, содержащие полипептидную последовательность, слитую с фрагментом антитела, содержащим Fc-область, подобные scFv-гибридам, таким как BsAb от ZymoGenetics/BMS, HERCULES от Biogen Idec (US007951918), SCORPIONS от Emergent BioSolutions/Trubion и

Zymogenetics/BMS, Ts2Ab (MedImmune/AZ (Dimasi, N., et al. J Mol Biol, 2009. 393(3): p. 672-92), гибрид scFv от Genetech/Roche, гибрид scFv от Novartis, гибрид scFv от Immunomedics, гибрид scFv от Changzhou Adam Biotech Inc (CN 102250246), TvAb от Roche (WO 2012025525, WO 2012025530), mAb2 от f-Star (WO2008/003116), и двойные scFv-гибриды. Также следует понимать, что термин антитело, если не указано иное, также включает поликлональные антитела, моноклональные антитела (такие как человеческие моноклональные антитела), смеси антител (рекомбинантные поликлональные антитела), например, созданные с помощью технологий, используемых Symphogen и Merus (Oligoclomics), мультимерные Fc-белки, как описано в WO2015/158867, гибридные белки, как описано в WO2014/031646, и антителоподобные полипептиды, такие как химерные антитела и гуманизированные антитела. Полученное антитело потенциально может обладать любым изотипом.

Термин «полноразмерное антитело» при использовании в данном документе относится к антителу (например, родительскому антителу), которое содержит все константные и переменные домены тяжелой и легкой цепей, соответствующие тем, которые обычно встречаются в антителе дикого типа этого изотипа.

При использовании в данном документе, подразумевается, что термин «человеческое антитело» включает антитела, содержащие переменные и константные области, выделенные из человеческих зародышевых последовательностей иммуноглобулинов. Человеческие антитела по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые человеческими зародышевыми последовательностями иммуноглобулинов (например, мутации, вставки или делеции, введенные неспецифическим или сайтспецифическим мутагенезом *in vitro* или соматическими мутациями *in vivo*). Однако, при использовании в данном документе, подразумевается, что термин «человеческое антитело» не включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мыши, были пересажены в человеческие каркасные последовательности.

Термин «химерное антитело» в контексте настоящего описания относится к антителу, в котором оба типа цепей, то есть тяжелая цепь и легкая цепь, являются химерными в результате инженерии антител. Химерная цепь - это цепь, которая содержит чужеродный переменный домен (происходящий от не относящихся к человеку видов, или синтетический или созданный от любого вида, включая человека), связанный с константной областью человеческого происхождения.

Используемый в данном документе термин «гуманизированное антитело»

относится к антителу, в котором оба типа цепи гуманизированы в результате инженерии антитела. Гуманизированная цепь обычно представляет собой цепь, в которой участки, определяющие комплементарность (CDR) переменных доменов, являются чужеродными (происходящими от других видов, кроме человека, или синтетическими), тогда как остальная часть цепи имеет человеческое происхождение. Оценка гуманизации основана на полученной аминокислотной последовательности, а не на методологии как таковой, которая позволяет использовать протоколы, отличные от пересадки.

При использовании в данном документе, термины «моноклональное антитело», «моноклональное Ab» или «композиция моноклональных антител» относятся к препарату Ab-молекул одиночной молекулярной композиции. Композиция моноклонального антитела демонстрирует уникальную специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу. Соответственно, термин «человеческое моноклональное антитело» относится к Ab, демонстрирующим уникальную специфичность связывания, и которые содержат переменные и константные области, выделенные из человеческих зародышевых последовательностей иммуноглобулинов. Человеческие mAb могут быть получены с помощью гибридомы, которая включает B-клетку, полученную от трансгенного или трансхромосомного животного, не являющегося человеком, такого как трансгенная мышь, имеющего геном, содержащий репертуар трансгена тяжелой цепи человека и репертуар трансгена легкой цепи, перестроенный для получения функционального человеческого антитела, и слитую с иммортализованной клеткой.

Термин «изотип», используемый в данном документе, относится к классу иммуноглобулинов (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgGA2, IgE или IgM или любым их аллотипам, таким как IgG1m (za) и IgG1m (f), который кодируется генами константной области тяжелой цепи. Кроме того, каждый изотип тяжелой цепи можно комбинировать с легкой цепью каппа (κ) или лямбда (λ). Используемый в данном документе термин «смешанный изотип» относится к Fc-области иммуноглобулина, полученной путем объединения структурных признаков одного изотипа с аналогичной областью из другого изотипа, с получением тем самым гибридного изотипа. Смешанный изотип может включать Fc-область, имеющую последовательность, состоящую из двух или более изотипов, выбранных из следующих IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgGA2, IgE или IgM, таким образом, генерируя комбинации, такие как, например, IgG1/IgG3, IgG1/IgG4, IgG2/IgG3, IgG2/IgG4 или IgG1/IgA.

Термин «антигенсвязывающая область», «антигенсвязывающая область», «связывающая область» или антигенсвязывающий домен в контексте настоящего описания относится к области антитела, которая способна связываться с антигеном. Эта

область связывания обычно определяется доменами VH и VL антитела, которые могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности (или гипервариабельные области, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или форме структурно определенных петель), также называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), вкрапленные более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Антиген может быть любой молекулой, такой как полипептид, например, присутствующий на клетке, бактерии или вирусе.

Термин «мишень» в контексте настоящего описания относится к молекуле, с которой связывается антигенсвязывающая область антитела. Мишень включает любой антиген, на который направлено индуцированное антитело. Термин «антиген» и «мишень» может относительно к антителу использоваться взаимозаменяемо и иметь то же значение и цель в отношении аспекта или воплощения настоящего изобретения.

Термин «эпитоп» означает молекулярную детерминанту, способную специфически связываться с вариабельным доменом антитела. Эпитопы обычно состоят из поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты, боковые цепи сахаров или их комбинации, и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы различаются тем, что связывание с первым, но не со вторым, прекращается в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп может содержать аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании (также называемые иммунодоминантным компонентом эпитопа), и другие аминокислотные остатки, которые непосредственно не участвуют в связывании.

«Антитело», «вариант антитела» или «вариант родительского антитела» по настоящему изобретению представляет собой молекулу антитела, которая содержит одну или несколько мутаций по сравнению с «исходным антителом». Различные термины могут использоваться взаимозаменяемо и составлять одно и то же значение и цель в отношении любого аспекта или воплощения настоящего изобретения. Типовые форматы родительских антител включают, без ограничения указанным, антитело дикого типа, полноразмерное антитело или Fc-содержащий фрагмент антитела, биспецифическое антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело или любую их комбинацию. Различные термины могут использоваться взаимозаменяемо и составлять одно и то же значение и цель в отношении любого аспекта или воплощения настоящего изобретения. Аминокислотные замены могут менять нативную аминокислоту на другую природную аминокислоту или на синтетическое производное аминокислоты.

Аминокислотная замена может быть консервативной или неконсервативной. В контексте настоящего изобретения, консервативные замены могут определяться заменами внутри классов аминокислот, отраженных в одной или более из следующих трех таблиц:

Классы аминокислотных остатков для консервативных замен

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

Альтернативные классы консервативных замен аминокислотных остатков

	A	S	T
	D	E	
	N	Q	
	R	K	
	I	L	M
	F	Y	W

Альтернативные Физические и Функциональные Классификации Аминокислотных Остатков

Остатки, содержащие спиртовую группу	S и T
Алифатические остатки	I, L, V, и M
Циклоалкил-ассоциированные остатки	F, H, W, и Y
Гидрофобные остатки	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, и Y
Отрицательно заряженные остатки	D и E
Полярные остатки	C, D, E, H, K, N, Q, R, S, и T
Положительно заряженные остатки	H, K, и R
Маленькие остатки	A, C, D, G, N, P, S, T, и V
Очень маленькие остатки	A, G, и S
Остатки, вовлеченные в образование изгиба	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P, и T
Гибкие остатки	Q, T, K, S, G, N, D, E и R

В контексте настоящего изобретения, замена в варианте указывается как:

Исходная аминокислота – положение – замененная аминокислота;

Используется трехбуквенный код или однобуквенный код, включая коды Хаа и Х для обозначения аминокислотного остатка. Соответственно, обозначение «E345R» или

«Glu345Arg» означает, что вариант включает замену Глутаминовой кислоты на Аргинин в аминокислотном положении варианта, соответствующем аминокислотному положению 345 в исходном антителе.

В случае, где положение, как таковое отсутствует в антителе, но вариант при этом содержит вставку аминокислоты, например:

Положение – замененная аминокислота; то используется обозначение, например, «448E».

Такое обозначение является особенно соответствующим в связи с модификацией(ями) в ряде гомологичных полипептидов или антител.

Аналогично, в случае, когда отсутствует идентичность замены аминокислотных остатков:

Исходная аминокислота – положение; или «E345».

Для модификации, где исходная(ые) аминокислота(ы) и/или замененная(ые) аминокислота(ы) могут содержать более чем одну, но не все аминокислоты, то замена Глутаминовой кислоты на Аргинин, Лизин или Триптофан в положении 345:

«Glu345Arg, Lys, Trp» или «E345R, K, W» или «E345R/K/W» или «E345 to R, K или W»

могут использоваться взаимозаменяемо в контексте настоящего изобретения.

Кроме того, термин «замена» охватывает замену на любую из других девятнадцати природных аминокислот, или на другую аминокислоту, такую как синтетическая аминокислота. Например, замена аминокислоты E в положении 345 включает каждую из следующих замен: 345A, 345C, 345D, 345G, 345H, 345F, 345I, 345K, 345L, 345M, 345N, 345P, 345Q, 345R, 345S, 345T., 345V, 345W и 345Y. Это эквивалентно обозначению 345X, где X обозначает любую аминокислоту. Эти замены также могут быть обозначены E345A, E345C и т.д., или E345A,C и т.д., или E345A/C/и т.д. То же самое применяется аналогично к каждому положению, упомянутому в данном документе, для специфичного включения в данный документ любой из таких замен.

Используемый в данном документе термин «эффекторная клетка» относится к иммунной клетке, которая участвует в эффекторной фазе иммунного ответа, в отличие от фаз распознавания и активации иммунного ответа. Типичные иммунные клетки включают клетки миелоидного или лимфоидного происхождения, например, лимфоциты (такие как В-клетки и Т-клетки, включающие цитолитические Т-клетки(CTL)), клетки-киллеры, естественные клетки-киллеры, макрофаги, моноциты, эозинофилы, полиморфоядерные клетки, такие как нейтрофилы, гранулоциты, тучные клетки и базофилы. Некоторые эффекторные клетки экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) или рецепторы комплемента и

несут специфичные иммунные функции. В некоторых воплощениях, эффекторная клетка, такая как, например, естественная клетка-киллер, способна индуцировать ADCC. Например, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки и клетки Купфера, которые экспрессируют FcR, вовлечены в специфичное уничтожение клеток-мишеней и презентирование антигенов другим компонентам иммунной системы, или в связывание с клетками, которые презентируют антигены. В некоторых воплощениях, ADCC может быть дополнительно усилена классической активацией системы комплемента, управляемой антителами, приводящей к депонированию активированных фрагментов C3 на клетке-мишени. Продукты расщепления C3 представляют собой лиганды рецепторов комплемента (CR), таких как CR3, экспрессирующихся на миелоидных клетках. Распознавание фрагментов комплемента с помощью CR на эффекторных клетках может стимулировать усиленную ADCC, опосредованную Fc-рецептором. В некоторых воплощениях, классическая активация системы комплемента, управляемая антителами, приводит к появлению фрагментов C3 на клетке-мишени. Эти продукты расщепления C3 могут стимулировать клеточную цитотоксичность, непосредственно зависящую от системы комплемента (CDCC). В некоторых воплощениях, эффекторная клетка может фагоцитировать антиген-мишень, частицу-мишень или клетку-мишень. Экспрессия конкретного FcR или рецептора комплемента на эффекторной клетке может регулироваться гуморальными факторами, такими как цитокины. Например, было обнаружено, что экспрессия FcγRI положительно регулируется интерфероном γ (IFN γ) и/или GCSF. Данная усиленная экспрессия повышает цитотоксическую активность FcγRI-несущих клеток против мишеней. Эффекторная клетка может фагоцитировать антиген-мишень, или фагоцитировать или лизировать клетку-мишень. В некоторых воплощениях, классическая активация системы комплемента, управляемая антителами, приводит к появлению фрагментов C3 на клетке-мишени. Эти продукты расщепления C3 могут стимулировать фагоцитоз непосредственно эффекторными клетками или косвенно путем усиления антитело-опосредованного фагоцитоза.

Термин «эффекторные функции Fc» или «Fc-опосредованные эффекторные функции» в контексте настоящего описания предназначен для обозначения функций, которые являются следствием связывания полипептида или антитела с его мишенью, такой как антиген, на клеточной мембране, где эффекторная функция Fc связана с Fc-областью полипептида или антитела. Примеры эффекторных функций Fc включают (i) связывание с C1q, (ii) активацию комплемента, (iii) комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), (iv) антителозависимую клеточно-опосредованную

цитотоксичность (ADCC), (v) связывание с рецептором Fc-гамма, (vi) антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), (vii) комплемент-зависимая клеточная цитотоксичность (CDCC), (viii) усиленную комплементом цитотоксичность, (ix) связывание с рецептором комплемента опсонизированного антитела, опосредованное антитела, (x) опсонизацию и (xi) комбинацию любого из (i) - (x).

Термин «зависимые от кластеризации функции», используемый в данном документе, предназначен для обозначения функций, которые являются следствием образования антигенных комплексов после олигомеризации полипептидов или антител, связанных с их антигенами, необязательно на клетке, на клеточной мембране, на вирионе или на другой частице. Примеры зависимых от кластеризации эффекторных функций включают (i) образование олигомера антитела, (ii) стабильность олигомера антитела, (iii) образование олигомера антигена, (iv) стабильность олигомера антигена, (v) индукцию апоптоза, (vi) модуляцию пролиферации, например, как уменьшение, ингибирование или стимуляцию пролиферации и (vii) комбинацию любого из (i) - (vi).

Термин «агонистический» в контексте настоящего описания понимается как стимуляция или активация рецептора на клеточной мембране, приводящая к биологической реакции, такой как внутриклеточная передача сигналов. Такой агонистический эффект может приводить к индукции апоптоза (запрограммированной гибели клеток), активации иммунных клеток или активации внутриклеточного пути.

Агонистическая активность или повышенная агонистическая активность может быть определена в анализе жизнеспособности антител, нацеленных на мишени, экспрессирующие домен внутриклеточной гибели, как описано в Примере 16, с использованием следующих стадий:

i) Посеять клеточную линию, экспрессирующую мишень, соответствующую антителу, например, DR5, в 96-луночной планшете с плоским дном из полистирола в течение ночи, 37°C,

ii) Добавить серийное разведение антитела, например, анти-DR5 антитело в диапазоне (от 0,0003 до 20000 нг/мл) и инкубируйте в течение 3 дней при 37°C,

iii) Определить жизнеспособность клеток путем количественного определения наличия АТФ, например, с использованием люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo,

iv) Рассчитать процент жизнеспособных клеток по следующей формуле: % жизнеспособных клеток = [(люминесценция образца антитела - люминесценция образца стауроспорина)/(люминесценция образца без антител - люминесценция образца стауроспорина)] * 100.

Агонистическая активность или повышенная агонистическая активность может быть определена в репортерном анализе для антител, нацеленных на мишени, активирующие внутриклеточный сигнальный путь, как описано в Примерах 29, 30, 31 и 32, с использованием следующих стадий:

- i) Посеять клетки Jurkat, стабильно трансфицированные мишенью и репортерным геном люциферазы ниже респонсивного элемента NFAT, инкубировать клетки в 96-луночном планшете с плоским дном в течение ночи при 37°C,
- ii) Добавьте серийное разведение антитела, например, антитело в диапазоне, например, От 19,5 до 5000 нг/мл и инкубировать в течение 5 часов,
- iii) Добавить к клеткам субстрат люциферазы светлячков (5'-фторолуциферин) и инкубировать в течение 5-10 минут.
- iv) Определить люминесценцию с помощью считывающего устройства Envision MultiLable Plate.

Подразумевается, что термин «вектор» при использовании в данном документе относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной индуцировать транскрипцию сегмента нуклеиновой кислоты, лигированного в вектор. Один из типов векторов представляет собой «плазмиду», которая представлена в форме циклической двухцепочечной ДНК. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор, где сегмент нуклеиновой кислоты может быть лигирован в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую их вводят (например, бактериальные векторы, содержащие бактериальную последовательность начала репликации, и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (такие как не эписомные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяин, и таким образом, они реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые вектора способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. В данном документе такие вектора называются «рекомбинантными экспрессирующими векторами» (или просто «экспрессирующими векторами»). В общем, экспрессирующие вектора используемые в методах рекомбинантных ДНК часто представлены в виде плазмид. В настоящем описании изобретения, термины «плазида» и «вектор» могут быть использованы взаимозаменяемо, поскольку плазида является наиболее часто используемой формой вектора. Однако подразумевается, что настоящее изобретение включает другие такие формы экспрессирующих векторов, такие как вирусные векторы (такие как дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и адено-ассоциированные вирус), которые выполняют эквивалентные функции.

Подразумевается, что термин «рекомбинантная клетка-хозяин» (или просто «клетка-хозяин»), при использовании в данном документе относится к клетке, в которую вводится экспрессирующий вектор. Следует понимать, что такие термины предназначены для обозначения не только определенного объекта в виде клетки, но также потомства такой клетки. Так как некоторые изменения могут происходить в последующих поколениях либо из-за мутации, либо влияния окружающей среды, то такое потомство может быть фактически не идентичным родительской клетке, но все еще включаться в объем термина «клетка-хозяин» используемый в данном документе. Рекомбинантные клетки-хозяева включают, например, трансфектомы, такие как клетки CHO, клетки HEK293, клетки PER.C6, клетки NS0 и лимфоцитарные клетки, а также прокариотические клетки, такие как *E.coli*, и другие эукариотические клетки-хозяева, такие как клетки растений и грибов. -

Термин «трансфектома», при использовании в данном документе включает рекомбинантные эукариотические клетки-хозяева, экспрессирующие Ab или антиген-мишень, такие как клетки CHO, PER.C6, клетки NS0, клетки HEK293, растительные клетки или грибы.

Термин «состав» относится к составам антительных вариантов и смесям различных антительных вариантов, которые могут иметь повышенную способность образовывать олигомеры при взаимодействии с антигеном, связанным с клеткой (например, антигеном, экспрессируемым на поверхности клетки), клеткой мембрана, вирион или другая структура, которая может приводить к усилению передачи сигналов и/или активации антигеном.

При использовании в данном документе термин «аффинность» представляет собой прочность связывания одной молекулы, например, антитела, с другой молекулой, например, мишенью или антигеном в единственном сайте, как например, моновалентное связывание индивидуального антиген-связывающего сайта антитела с антигеном.

При использовании в данном документе, термин «авидность» относится к объединенной прочности множества сайтов связывания между двумя структурами, как например, между множеством антиген-связывающих сайтов антител, одновременно взаимодействующих с мишенью или, например, между антителом и C1q. Когда присутствует более одного связывающего взаимодействия, две структуры будут диссоциировать только тогда, когда диссоциируют все сайты связывания, и, таким образом, скорость диссоциации будет ниже, чем для отдельных сайтов связывания, и, таким образом, обеспечит большую эффективную общую силу связывания (авидность) по сравнению с силой связывания отдельных сайтов связывания (аффинности).

Используемый в данном документе термин «олигомер» относится к молекуле, которая состоит из более чем одной, но ограниченного числа мономерных единиц (например, антител), в отличие от полимера, который, по меньшей мере, в принципе, состоит из неограниченного числа мономеров. Примеры олигомеров представляют собой димеры, тримеры, тетрамеры, пентамеры и гексамеры. Греческие приставки часто используются для обозначения количества мономерных единиц в олигомере, например, тетрамер состоит из четырех единиц, а гексамер состоит из шести единиц.

Термин «олигомеризация», используемый в данном документе, предназначен для обозначения процесса, который превращает мономеры до конечной степени полимеризации. В данной работе наблюдалось, что антитела, содержащие области связывания мишени согласно изобретению, могут образовывать олигомеры, такие как гексамеры, посредством нековалентной ассоциации областей Fc после связывания мишени, например, на поверхности клетки. В контексте настоящей заявки «самоолигомеризация» или «автоолигомеризация» предназначена для обозначения процесса олигомеризации между молекулами антител, которые имеют идентичные белковые последовательности, без учета посттрансляционных модификаций. Термин «гетероолигомеризация», используемый в данном документе, предназначен для обозначения процесса олигомеризации между молекулами антител, которые имеют разные белковые последовательности, без учета посттрансляционных модификаций. Различные антитела, участвующие в гетероолигомеризации, могут, например, связывать разные антигены, такие как разные целевые белки, гликопротеины, гликаны или гликолипиды.

Термин «замещение, ингибирующее самоолигомеризацию» или «замещение, ингибирующее самоолигомеризацию» предназначен для обозначения замены в антителе, содержащем Fc-область иммуноглобулина и антигенсвязывающую область, которая ингибирует процесс олигомеризации между молекулы антител, которые имеют идентичные белковые последовательности без учета посттрансляционных модификаций. Ингибирование самоолигомеризации может, например, привести к увеличению EC50 активности CDC или снижению максимальной активности CDC лизиса полипептида, измеренной в соответствии со способами, описанными в примерах 2 и 15. Примерами замен, ингибирующих самоолигомеризацию, являются K439E и S440K.

Используемый в данном документе термин «кластеризация» предназначен для обозначения олигомеризации антител, полипептидов, антигенов или других белков через нековалентные взаимодействия.

Термин «усиление Fc-Fc» в контексте настоящего описания предназначен для

обозначения увеличения силы связывания или стабилизации взаимодействия между Fc-областями двух Fc-областей, содержащих антитела или полипептиды, так что полипептиды образуют олигомеры на мишени. привязка.

Замены, усиливающие Fc-Fc, в контексте настоящего описания относятся к заменам в следующих положениях, соответствующих IgG1 человека согласно нумерации EU, E430, E345 или S440, при условии, что замены в положении S440 представляют собой S440Y или S440W. Таким образом, замены, усиливающие Fc-Fc, в контексте настоящего описания относятся к следующим аминокислотным заменам E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W и S440Y. В предпочтительном воплощении замена, усиливающая Fc-Fc, представляет собой E430G, E345K или E345R.

При использовании в данном документе в контексте двух антигенов термин «совместно расположенный» или его грамматические вариации предназначен для обозначения, с одной стороны, ситуаций, когда два антигена совместно экспрессируются в одной и той же клетке. Антигены могут уже находиться рядом друг с другом на клетке, или антигены могут быть объединены посредством олигомеризации связывающих полипептидов, например, антитела по изобретению. Кроме того, термин «совместно расположенный» также предназначен для обозначения ситуаций, в которых два антигена экспрессируются на разных клетках, но при этом такие клетки расположены в непосредственной близости друг от друга.

Термин «взаимозависимый» в контексте настоящего описания предназначен для обозначения функционального эффекта, который зависит от одновременного связывания двух или более различных полипептидов, содержащих Fc-домен, с заменами, ингибирующими самоолигомеризацию, с одной и той же мишенью, клеткой, или вирион. В контексте настоящего изобретения функциональные эффекты, которые могут быть взаимозависимыми, включают кластерно-зависимые функции, Fc-опосредованные эффекторные функции и связывание эффекторных молекул, таких как Fc γ R или C1, но не обязательно индивидуальное связывание Fc-домена, содержащие полипептиды к своим антигенам-мишеням. В данном контексте разные полипептиды, содержащие Fc-домен с заменами, ингибирующими самоолигомеризацию, могут каждый индивидуально связывать разные мишени, клетки или вирионы, но взаимозависимый функциональный результат зависит от одновременного связывания двух или более различных компонентов с одной и той же мишенью, клеткой или вирионом. В данном контексте взаимозависимые функциональные эффекты восстанавливаются, в частности, двумя или более различными полипептидами, содержащими Fc-домен, с заменами, ингибирующими самоолигомеризацию, за счет восстановления нековалентных взаимодействий Fc-Fc

между различными компонентами в смеси взаимозависимых Fc-содержащих полипептидов.

Используемый в данном документе термин «запас безопасности» предназначен для обозначения индекса эффективности и безопасности лекарственного средства и определяется как диапазон между минимальной терапевтической дозой (эффективность для пораженной ткани) и минимальной токсической дозой (эффективность для здоровых тканей) лекарственного средства.

Используемый в данном документе термин «связывание с C1q» предназначен для обозначения прямого взаимодействия между C1q и антителом. Прямое связывание с C1q можно оценить, например, с помощью иммобилизованного антитела на искусственной поверхности. Поливалентное взаимодействие, приводящее к высокой avidности связывания с C1q с олигомером антитела, может быть оценено при связывании с заранее определенным антигеном на поверхности клетки или вириона.

Связывание C1q с полипептидом или антителом можно определить в анализе ELISA с использованием следующих стадий: i) покрытие 96-луночного планшета Microton для ELISA 1 мкг/мл полипептида или антитела в 100 мкл PBS при 4°C в течение ночи, ii) инкубирование планшета со 100 мкл/лунку серии серийных разведений C1q, конечный диапазон концентраций C1q 30-0,01 мкг/мл в 3-кратных разведениях в течение 1 часа при 37°C, iii) инкубирование планшета со 100 мкл/лунку кроличьего антитела против C1q человека в течение 1 часа при комнатной температуре, iv) инкубирование планшета со 100 мкл/лунку свиного антитела против IgG кролика, конъюгированного с HRP, в течение 1 часа при комнатной температуре, v) инкубирование планшета со 100 мкл/лунку субстрата с 1 мг/мл 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) в течение 15 минут при комнатной температуре, vi) отсасывание реактива добавлением 100 мкл 2% щавелевой кислоты на лунку. Поглощение измеряют при 405 нм в считывающем устройстве для микропланшетов BioTek EL808.

Термин «замена связывания с C1q», используемый в данном документе, предназначен для обозначения замены в полипептиде, содержащем Fc-область иммуноглобулина и антигенсвязывающую область, которая усиливает прямое взаимодействие с C1q. Усиленное связывание с C1q может, например, приводить к снижению EC50 взаимодействия между C1q и полипептидом, содержащим Fc-область иммуноглобулина и антигенсвязывающую область, измеренную в соответствии с описанным выше способом определения связывания с C1q.

Используемый в данном документе термин «активация комплемента» относится к активации классического пути комплемента, который инициируется большим

макромолекулярным комплексом, называемым связыванием C1 с комплексами антитело-антиген на поверхности. C1 представляет собой комплекс, состоящий из 6 белков распознавания C1q и гетеротетрамера сериновых протеаз C1r2C1s2. C1 - это первый белковый комплекс на ранних стадиях классического каскада комплемента, который включает серию реакций расщепления, которые начинаются с расщепления C4 на C4a и C4b и C2 на C2a и C2b. C4b откладывается и вместе с C2a образует ферментативно активную конвертазу, называемую C3-конвертазой, которая расщепляет компонент C3 комплемента на C3b и C3a, который образует C5-конвертазу. Эта C5-конвертаза расщепляет C5 на C5a и C5b, и последний компонент депонируется на мембране, что, в свою очередь, запускает поздние события активации комплемента, при которых конечные компоненты комплемента C5b, C6, C7, C8 и C9 собираются в комплекс атаки на мембрану (MAC). Каскад комплемента приводит к созданию пор в клеточной мембране, что вызывает лизис клетки, также известный как комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC). Активацию комплемента можно оценить с помощью эффективности C1q, CDC-анализов кинетики CDC (как описано в WO2013/004842, WO2014/108198) или методом клеточного депонирования C3b и C4b, описанного в Beurskens et al. в *Journal of Immunology*, 2012 vol. 188 no. 7, April 1, 3532-3541.

Термин «комплемент-зависимая цитотоксичность» («CDC») в контексте настоящего описания предназначен для обозначения процесса опосредованной антителами активации комплемента, ведущего к лизису клетки или вириона, когда антитело связывается со своей мишенью на клетке или вирионе. вирион в результате пор в мембране, созданных сборкой MAC.

Подразумевается, что термин «антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» («ADCC») при использовании в данном документе относится к механизму уничтожения клеток-мишеней или вирионов, покрытых антителами, с помощью клеток, экспрессирующих Fc-рецепторы, которые распознают константную область связанного антитела. Подразумевается, что термин «антитело-зависимый клеточный фагоцитоз» («ADCP») при использовании в данном документе относится к механизму исключения клеток-мишеней или вирионов, покрытых антителами, с помощью интернализации фагоцитами. Интернализованные клетки-мишени или вирионы, покрытые антителами, содержатся в везикулах, называемых фагосома, которые затем сливаются с одной или с несколькими лизосомами с образованием фаголизосом. ADCP может оцениваться с использованием анализа цитотоксичности *in vitro* с помощью макрофагов в качестве эффекторных клеток и с использованием видеомикроскопии, как описано в Bij et al. в *Journal of Hepatology* Volume 53, Issue 4, October 2010, Pages 677–685.

Подразумевается, что термин «комлемент-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» («CDCC») при использовании в данном документе относится к механизму уничтожения клеток-мишеней или вирионов с помощью клеток, экспрессирующих рецепторы комплемента, которые распознают продукты расщепления компонента комплемента 3 (C3), которые ковалентно связываются с клетками-мишенями или с вирионами в результате антитело-опосредованной активации комплемента. CDCC может оцениваться аналогичным образом, как описано для ADCC.

Термин «период полужизни в плазме» при использовании в данном документе обозначает время, которое затрачивается для уменьшения концентрации полипептида в плазме крови наполовину от исходной концентрации в процессе элиминации (после фазы распределения). Для антител фаза распределения обычно составляет 1-3 дня, в течение которой происходит около 50% снижение концентрации в плазме крови из-за перераспределения между плазмой и тканями. Период полужизни в плазме можно измерить способами, хорошо известными в данной области.

Термин «скорость клиренса из плазмы» при использовании в данном документе обозначает количественное измерение скорости, с которой полипептид удаляется из крови при введении живому организму. Скорость клиренса из плазмы может быть рассчитана как доза/AUC (мл/день/кг), где значение AUC (площадь под кривой) определяется из кривой зависимости концентрации от времени.

Термин «конъюгат антитело-антиген», при использовании в данном документе относится к антителу или к Fc-содержащему полипептиду, обладающему специфичностью, по меньшей мере, к одному типу раковой клетки, к лекарственному средству и линкеру, соединяющему лекарственное средство, например, с антителом. Линкер является расщепляемым или нерасщепляемым в присутствии раковой клетки; где конъюгат антитело-лекарственное средство уничтожает раковую клетку.

Термин «поглощение конъюгата антитело-лекарственное средство», при использовании в данном документе относится к способу, в котором конъюгаты антитело-лекарственное средство связываются с мишенью на клетке с последующим поглощением/поглощением клеточной мембраной и посредством этого засасывается в клетку. Поглощение конъюгата антитело-лекарственное средство может оцениваться как «антитело-опосредованная интернализация и клеточное уничтожение с помощью анти-TF ADC в анализе уничтожения *in vitro*», как описано в WO 2011/157741.

Термин «апоптоз» в контексте настоящего описания относится к процессу запрограммированной гибели клеток (PCD), который может происходить в клетке. Биохимические события приводят к характерным изменениям (морфологии) и гибели

клеток. Эти изменения включают образование пузырьков, сморщивание клетки, фрагментацию ядра, конденсацию хроматина и фрагментацию хромосомной ДНК. Связывание антитела с конкретным рецептором может индуцировать апоптоз.

Термин «запрограммированная клеточная смерть» или «PCD» в контексте настоящего описания относится к смерти клетки в любой форме, опосредованной внутриклеточной программой. Существуют разные формы PCD, у разных типов PCD общее то, что они выполняются активными клеточными процессами, которые могут быть перехвачены путем вмешательства во внутриклеточную передачу сигналов. В конкретном воплощении возникновение любой формы PCD в клетке или ткани можно определить путем окрашивания клетки или ткани конъюгированным аннексином V, что коррелирует с воздействием фосфатидилсерина.

Термин «аннексин V» в контексте настоящего описания относится к белку из группы аннексина, который связывает фосфатидилсерин (PS) на поверхности клетки.

Подразумевается, что термин «FcRn», при использовании в данном документе, относится к неонатальному Fc-рецептору, который представляет собой Fc-рецептор. Впервые он был открыт у грызунов в качестве уникального рецептора, способного транспортировать IgG из материнского молока по эпителию кишечника новорожденных грызунов в кровотоки новорожденных. Дальнейшие исследования обнаружили аналогичный рецептор у людей. Однако у людей он был обнаружен в плаценте для того, чтобы помогать облегчать транспорт материнского IgG растущему плоду, и было показано, что он играет роль в мониторинге обновления IgG. FcRn связывает IgG при кислом pH 6–6,5, но не при нейтральном или более высоком pH. Таким образом, FcRn может связывать IgG из полости кишечника (внутренняя область кишечника) при слегка кислом pH и гарантирует эффективный однонаправленный транспорт в базолатеральную область (внутри тела), где pH нейтральный или основной (pH 7–7,5). Данный рецептор играет роль у взрослых в реутилизации IgG через его присутствие в пути эндоцитоза в эндотелиальных клетках. FcRn-рецепторы в кислых эндосомах связываются с IgG, интернализированным через фагоцитоз, возвращая его на клеточную поверхность, высвобождая его при основном pH крови, посредством чего предотвращают его от воздействия лизосомной деградации. Данный механизм может обеспечить объяснение для более высокого периода полужизни IgG в крови по сравнению с другими изотипами.

Подразумевается, что термин «протеин A», при использовании в данном документе, относится к 56 кДа поверхностному белку MSCRAMM, изначально обнаруженному на клеточной стенке бактерии *Staphylococcus aureus*. Он кодируется геном *sra* и его регуляция контролируется топологией ДНК, клеточной осмоляльностью и

двухкомпонентной системой, называемой ArlS-ArlR. Этот белок нашел применение в биохимических исследованиях его способности связываться с иммуноглобулинами. Он состоит из пяти гомологичных Ig-связывающих домена, которые собираются в трехспиральный узел. Каждый домен способен связываться с белками из множества видов млекопитающих, по большей части с IgG. Он связывается с областью Fc тяжелой цепи большинства иммуноглобулинов (перекрывая консервативный сайт связывания FcRn-рецепторов), а также взаимодействует с областью Fab семейства VH3 человека. Посредством этих взаимодействий в сыворотке молекулы IgG связываются с бактериями через их Fc-область вместо единственного связывания через их Fab-области, с помощью которых бактерии нарушают опсонизацию, активацию комплемента и фагоцитоз.

Подразумевается, что термин «протеин G», при использовании в данном документе относится к белку, связывающему иммуноглобулин, экспрессированному в группе C и G стрептококковых бактерий, очень похожему на протеин A, но с другими специфичностями. Этот белок представляет собой 65-кДа (G148 протеин G) и 58 кДа (C40 протеин G) белок клеточной поверхности, который нашел применение в очистке антител посредством его связывания с Fc-областью.

Конкретные воплощения изобретения

Как описано в данном документе, в первом аспекте изобретение относится к первому антителу для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом, где активность первого и второго антитела является взаимозависимой, и первое антитело имеет Fc-область, имеющую одну замену, усиливающую Fc-Fc, замену, ингибирующую самоолигомеризацию, и одну или несколько замен, которые снижают эффекторные функции, такие как CDC и/или ADCC, а второе антитело имеет Fc-область, содержащую одну замену, усиливающую Fc-Fc, ингибирующую самоолигомеризацию, и необязательно одну или несколько замен, которые усиливают эффекторные функции Fc, такие как CDC и/или ADCC. Таким образом, такая комбинация первого и второго антитела, в которой действие первого антитела зависит от присутствия второго антитела, а действие второго антитела зависит от присутствия первого антитела, может увеличить запас безопасности для использования такой комбинации первого и второго антитела.

Как показали авторы настоящего изобретения, первое антитело, которое имеет Fc-область, содержащую одну замену, усиливающую Fc-Fc, и одну или несколько замен, которые снижают эффекторные функции, такие как CDC и/или ADCC, и комплементарную замену, ингибирующую самоолигомеризацию, не проявляет активности CDC или проявляет лишь очень ограниченную активность при использовании

в качестве одиночного антитела. Подобно второму антителу по изобретению, которое имеет Fc-область, имеющую одну замену, усиливающую Fc-Fc, и одну или несколько замен, которые усиливают эффекторные функции Fc, такие как CDC и/или ADCC, и комплементарную замену, ингибирующую самоолигомеризацию, демонстрирует только ограниченная активность CDC при использовании в качестве отдельного антитела. Однако неожиданно комбинация первого и второго антитела по изобретению способна восстанавливать индуцированный уровень CDC, в то время как отдельные агенты не проявляют или не проявляют ограниченной способности индуцировать CDC.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает первое антитело, содержащее первую Fc-область IgG человека и первую антигенсвязывающую область, способную связываться с первым антигеном, для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом, содержащим вторую Fc-область IgG человека и вторую антигенсвязывающую область, способную связываться со вторым антигеном, причем указанная первая Fc-область включает

а. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

б. замену K439E или S440K, при условии, что замена не является S440K, если замена в (а) представляет собой S440Y или S440W, и

с. одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из: L234, L235, G237, G236, или одну или нескольких замен, выбранных из группы, состоящей из: K322A и E269K;

а указанная вторая Fc-область включает

д. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

е. замену K439E или S440K, при условии, что замена не S440K, если замена в (d) представляет собой S440Y или S440W и

где первая Fc-область имеет замену K439E, а вторая Fc-область имеет замену S440K, или первая Fc-область имеет замену S440K, а вторая Fc-область имеет замену K439E; где положения аминокислот соответствуют IgG1 человека в соответствии с системой нумерации EU.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает первое антитело, содержащее первую Fc-область IgG человека и первую антигенсвязывающую область, способную связываться с первым антигеном, для применения в качестве лекарственного

средства в комбинации со вторым антителом, содержащим вторую Fc-область IgG человека и второй антигенсвязывающей области, способной связываться со вторым антигеном, причем указанная первая Fc-область включает

a. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

b. замену K439E или S440K, при условии, что замена не является S440K, если замена в (a) представляет собой S440Y или S440W, и

c. одну замену аминокислоты в положении G237 или одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R, G236K, K322A, E269K, K322E, P329R, L234A, L234F, L235A, L235Q и L235E;

а указанная вторая Fc-область включает

d. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

e. замену K439E или S440K, при условии, что замена не S440K, если замена в (d) представляет собой S440Y или S440W и

f. одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: K326A, K326W, E333A и E333S, если первая Fc-область включает замену K322E или P329R;

где первая Fc-область имеет замену K439E, а вторая Fc-область имеет замену S440K или первая Fc-область имеет замену S440K, а вторая Fc-область имеет замену K439E; где аминокислотные положения соответствуют IgG1 человека в соответствии с системой нумерации EU (Edelman et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1969 May;63(1):78-85; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. 1991 NIH Publication No. 91-3242).

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает первое антитело, содержащее первую Fc-область IgG человека и первую антигенсвязывающую область, способную связываться с первым антигеном, для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом, содержащим вторую Fc-область IgG человека и вторую антигенсвязывающую область, способную связываться со вторым антигеном, причем указанная первая Fc-область включает

a. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

b. замену K439E или S440K, при условии, что замена не является S440K, если

замена в (a) представляет собой S440Y или S440W, и

с. одну замену аминокислоты в положении G237 или одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R, G236K, K322A, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q и L235E;

а указанная вторая Fc-область включает

d. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

е. замену K439E или S440K, при условии, что замена не S440K, если замена в (d) представляет собой S440Y или S440W и

где первая Fc-область имеет замену K439E, а вторая Fc-область имеет замену S440K, или первая Fc-область имеет замену S440K, а вторая Fc-область имеет замену K439E; где положения аминокислот соответствуют IgG1 человека в соответствии с системой нумерации EU.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает первое антитело, содержащее первую Fc-область IgG человека и первую антигенсвязывающую область, способную связываться с первым антигеном, для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом, содержащим вторую Fc-область IgG человека и вторую антигенсвязывающую область, способную связываться со вторым антигеном, причем указанная первая Fc-область включает

a. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

b. замену K439E или S440K, при условии, что замена не является S440K, если замена в (a) представляет собой S440Y или S440W, и

с. одну замену аминокислоты в положении P329 или замену K322E;

а указанная вторая Fc-область включает

d. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

е. замену K439E или S440K, при условии, что замена не S440K, если замена в (d) представляет собой S440Y или S440W и

f. одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: K326A, K326W, E333A и E333S;

где первая Fc-область имеет замену K439E, а вторая Fc-область имеет замену

S440K или первая Fc-область имеет замену S440K, а вторая Fc-область имеет замену K439E; где положения аминокислот соответствуют IgG1 человека в соответствии с системой нумерации EU.

Замена в положении, соответствующем замене E430, E345 или S440Y или S440W, считается заменой, усиливающей Fc-Fc, согласно настоящему изобретению, такая замена вводит эффект усиленных взаимодействий Fc-Fc и олигомеризации в полипептиде или антителе. Усиленная олигомеризация происходит, когда антигенсвязывающая область антитела связывается с соответствующим антигеном-мишенью. Усиленная олигомеризация позволяет получить олигомеры, такие как, например, гексамеры. Создание олигомерных структур, таких как гексамеры, имеет эффект увеличения эффекторных функций Fc, например, CDC за счет увеличения avidности связывания с C1q полипептида.

В одном воплощении первое антитело включает не более одной замены в положении, соответствующем замене E430, E345 или S440Y или S440W. В одном воплощении второе антитело включает не более одной замены в положении, соответствующем замене E430, E345 или S440Y или S440W. Таким образом, в одном воплощении Fc-область включает не более одной замены в положении, соответствующем замене E430, E345 или S440Y или S440W. В одном воплощении изобретения первая Fc-область и вторая Fc-область включают замену, выбранную из группы, состоящей из: E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W и S440Y. Таким образом, в одном воплощении первая Fc-область может иметь замену E430G, а вторая Fc-область может иметь замену E345K. В другом воплощении первая Fc-область может иметь замену E345K, а второе антитело может иметь замену E430G. Замена в первой и второй Fc-области может быть выбрана независимо из группы замен, усиливающих Fc-Fc.

В одном воплощении изобретения первая и вторая Fc-области включают замену, выбранную из группы, состоящей из: E430G, E345K и E345R.

В одном воплощении изобретения первая и вторая Fc-области включают замену E430G. В одном воплощении изобретения первая и вторая Fc-области включают замену E345K. В одном воплощении изобретения первая и вторая Fc-области включают замену E345R. В одном воплощении изобретения первая и вторая Fc-области включают замену S440Y.

Первая и вторая Fc-области дополнительно включают замену K439E или S440K, которая в соответствии с настоящим изобретением рассматривается как комплементарные замены, ингибирующие олигомеризацию. Это первое антитело, имеющее, например, K439E может не образовывать олигомеры с другим антителом, имеющим замену K439E,

однако антитело, имеющее замену K439E, может образовывать олигомеры с другим антителом, имеющим замену S440K. Антитело, имеющее замену S440K, может не образовывать олигомеры с другим антителом, имеющим замену S440K, но может образовывать олигомеры с антителом, имеющим замену K439E. Таким образом, в одном воплощении изобретения первая Fc-область включает замену K439E, а вторая Fc-область включает замену S440K. В одном воплощении первая Fc-область включает замену S440K, а вторая Fc-область включает замену K439E. Когда Fc-область включает замену, ингибирующую олигомеризацию S440K, тогда Fc-область может не содержать замену, усиливающую Fc-Fc S440Y или S440W. Таким образом, Fc-область, имеющая замену ингибирования олигомеризации S440K, может иметь замену, усиливающую Fc-Fc, в аминокислотном положении, соответствующем E430 или E345.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает первое антитело, содержащее первую Fc-область IgG человека и первую антигенсвязывающую область, способную связываться с первым антигеном, для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом, содержащим вторую Fc-область IgG человека и второй антигенсвязывающей области, способной связываться со вторым антигеном, причем указанная первая Fc-область включает

- a. замену K248E и T437R, и
- b. замену K439E или S440K, и
- c. одну замену аминокислоты в положении G237 или P329, или одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R, G236K, K322A, K332E, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q и L235E;

а указанная вторая Fc-область включает

- d. замену K248E и T437R, и
- e. замену K439E или S440K,

где первая Fc-область имеет замену K439E, а вторая Fc-область имеет замену S440K, или первая Fc-область имеет замену S440K, а вторая Fc-область имеет замену K439E; где положения аминокислот соответствуют IgG1 человека в соответствии с системой нумерации EU.

Замещение, усиливающее Fc-Fc, в положении, соответствующем замене E430, E345 или S440Y или S440W, согласно любому аспекту или воплощению настоящего изобретения, может быть заменено на следующие две замены T248E и T437R.

В одном воплощении изобретения первая Fc-область включает замену, которая снижает эффекторные функции, такие как CDC и/или ADCC. Таким образом, в одном воплощении изобретения первая Fc-область включает замену, которая снижает CDC. В

одном воплощении изобретения первая Fc-область включает замену, которая снижает ADCC. В одном воплощении первая Fc-область включает замену, которая снижает CDC и ADCC.

В одном воплощении изобретения первая Fc-область включает одну аминокислотную замену в положении G237. Замена в положении аминокислоты G237 может иметь эффект снижения способности антител индуцировать CDC. В данном документе предусмотрены воплощения, в которых первая Fc-область включает замену, которая помимо снижения активности CDC может также снижать связывание рецептора Fc-гамма и, таким образом, опосредованные рецептором Fc-гамма эффекторные функции.

В одном воплощении изобретения первая Fc-область включает одну замену, выбранную из группы, состоящей из: G237A, G237T, G237Q, G237R, G237S, G237N, G237D, G237E, G237K, G237V, G237M, G237I, G237L, G237H, G237F, G237Y, G237W и G237P.

Авторы изобретения обнаружили, что при замене глицина в положении, соответствующем 237 в человеческом IgG1, аминокислотой, такой как аланин, треонин, глутамин или аргинин, которые представляют собой различные классы природных аминокислот, способность антитела индуцировать CDC была снижена. Таким образом, считается, что любая замена G237 другой природной аминокислотой снижает способность антител индуцировать CDC. Замена в положении аминокислоты G237 может снизить способность антитела, содержащего замену, усиливающую Fc-Fc, и замену, ингибирующую самоолигомеризацию, индуцировать CDC самостоятельно.

В одном воплощении изобретения первая Fc-область включает одну замену, выбранную из группы, состоящей из: G237T, G237A, G237Q и G237R. В одном воплощении первая Fc-область включает замену G237T. В одном воплощении изобретения первая Fc-область включает замену G237A. В одном воплощении изобретения первая Fc-область включает замену G237S. В одном воплощении изобретения первая Fc-область включает замену G237Q. В одном воплощении изобретения первая Fc-область включает замену G237R.

В одном воплощении изобретения первая Fc-область включает одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R, G236K, E269K и P329R. В одном воплощении изобретения первая Fc-область включает замену L234F и L235E. В данном документе предусмотрены воплощения, в которых первая Fc-область включает замену, которая помимо снижения активности CDC может также снижать связывание рецептора Fc-гамма и, таким образом, опосредованные рецептором Fc-гамма эффекторные функции.

В одном воплощении изобретения первая Fc-область включает одну или несколько

замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R, G236K и E269K. В одном воплощении изобретения первая Fc-область включает одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R и E269K. В одном воплощении изобретения первая Fc-область включает замену G263R или G236K. В одном воплощении изобретения первая Fc-область включает замену G236R. В одном воплощении изобретения первая Fc-область включает замену G236K. В одном воплощении изобретения первая Fc-область включает замену G269K.

В одном воплощении изобретения первая Fc-область включает одну замену, выбранную из группы, состоящей из: K322A и K322E. В данном документе предлагается воплощение, в котором первая Fc-область включает замену, которая может снижать способность антител индуцировать активность CDC, сохраняя при этом способность антител связывать рецепторы Fc-гамма.

В одном воплощении изобретения первая Fc-область включает замену K322A.

В одном воплощении изобретения первая Fc-область включает замену K322E.

В одном воплощении изобретения первая Fc-область включает аминокислотную замену в положении P329.

В одном воплощении изобретения первая Fc-область включает замену, выбранную из группы, состоящей из: P329R, P329K, P329E, P329D и P329A. В одном воплощении изобретения первая Fc-область включает замену P329R. В одном воплощении изобретения первая Fc-область включает замену P329R. В одном воплощении изобретения первая Fc-область включает замену P329K. В одном воплощении изобретения первая Fc-область включает замену P329E. В одном воплощении изобретения первая Fc-область включает замену P329D. В одном воплощении изобретения первая Fc-область включает замену P329A.

Таким образом, предлагаются воплощения, в которых первое антитело включает первую Fc-область, которая имеет замену, усиливающую Fc-Fc, которая вводит эффект усиленных взаимодействий Fc-Fc и олигомеризации антитела. Усиленная олигомеризация происходит, когда антигенсвязывающая область антитела связывается с соответствующим антигеном-мишенью. Усиленная олигомеризация позволяет получить олигомеры, такие как, например, гексамеры. Создание олигомерных структур, таких как гексамеры, имеет эффект увеличения эффекторных функций Fc, например, CDC за счет увеличения авидности связывания с C1q полипептида. Однако путем введения замены, ингибирующей самоолигомеризацию, и замены, которая снижает эффекторные функции, такие как CDC и/или ADCC, получается антитело, которое имеет пониженные эффекторные функции, такие как CDC и/или ADCC, что может позволить улучшить контроль токсичного

профиля антитела в сочетании со вторым антителом. То, что первое антитело имеет пониженные эффекторные функции, такие как CDC и/или ADCC, следует понимать так, как если бы первое антитело сравнивали с исходным антителом, имеющим такую же замену, усиливающую Fc-Fc, и замену, ингибирующую самоолигомеризацию, но не замену, которая снижает эффекторные функции.

В одном воплощении изобретения вторая Fc-область включает замену, которая увеличивает эффекторные функции, такие как CDC и/или ADCC. Таким образом, в одном воплощении вторая Fc-область включает замену, которая увеличивает CDC. В одном воплощении вторая Fc-область включает замену, которая увеличивает ADCC. В одном воплощении вторая Fc-область включает замену, которая увеличивает CDC и ADCC. То, что второе антитело имеет повышенные эффекторные функции, такие как CDC и/или ADCC, следует понимать так, как если бы второе антитело сравнивали с исходным антителом, имеющим такую же замену, усиливающую Fc-Fc, и замену, ингибирующую самоолигомеризацию, но не замену, которая усиливает эффекторные функции.

В одном воплощении изобретения вторая Fc-область включает одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G237A, K326A, K326W, E333A и E333S.

В одном воплощении изобретения вторая Fc-область включает замену G237A. В одном воплощении изобретения вторая Fc-область включает замену, которая снижает связывание рецептора Fc-гамма, такую как G237A.

В одном воплощении изобретения вторая Fc-область включает одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: K326A, K326W, E333A и E333S.

В одном воплощении изобретения вторая Fc-область включает одну замену, выбранную из группы, состоящей из: K326A, K326W, E333A и E333S.

В одном воплощении изобретения вторая Fc-область включает одну замену, выбранную из группы, состоящей из: K326A, K326W, E333A и E333S. В одном воплощении изобретения вторая Fc-область включает замену K326A. В одном воплощении изобретения вторая Fc-область включает замену K326W. В одном воплощении изобретения вторая Fc-область включает замену E333A. В одном воплощении изобретения вторая Fc-область включает замену E333S.

В одном воплощении изобретения вторая Fc-область включает две замены, выбранные из группы, состоящей из: K326A, K326W, E333A и E333S.

В одном воплощении изобретения вторая Fc-область включает замену K326W и E333S. В одном воплощении изобретения вторая Fc-область включает замену K326A и E333A.

В одном воплощении изобретения вторая Fc-область включает замену G237A и

E333S.

В одном воплощении изобретения вторая Fc-область включает замену K326A.

В одном воплощении изобретения вторая Fc-область включает замену E333S.

Таким образом, представлены воплощения, в которых второе антитело включает вторую Fc-область, которая имеет замену, усиливающую Fc-Fc, которая вводит эффект усиленных взаимодействий Fc-Fc и олигомеризации антитела. Усиленная олигомеризация происходит, когда антигенсвязывающая область антитела связывается с соответствующим антигеном-мишенью. Усиленная олигомеризация позволяет получить олигомеры, такие как, например, гексамеры. Создание олигомерных структур, таких как гексамеры, имеет эффект увеличения эффекторных функций Fc, например, CDC за счет увеличения авидности связывания с C1q полипептида. Однако путем введения замены, которая увеличивает эффекторные функции, такие как CDC и/или ADCC, генерируется антитело, которое имеет повышенную олигомеризацию и повышенные эффекторные функции, такие как CDC и/или ADCC, что может позволить повысить эффективность антитела в сочетании с первым антителом. То, что второе антитело имеет повышенные эффекторные функции, такие как CDC и/или ADCC, следует понимать так, как если бы второе антитело сравнивали с исходным антителом, имеющим такую же замену, усиливающую Fc-Fc, и замену, ингибирующую самоолигомеризацию, но не замену, которая увеличивает эффекторные функции.

В следующей таблице представлен неограничивающий список воплощений, описывающий комбинации первого полипептида и второго полипептида со специфическими заменами. Таким образом, например, воплощение 1 в таблице ниже представляет собой комбинацию первого антитела, содержащего замены в положениях, соответствующих E430G, K439E и G236R, соответственно, в человеческом IgG, со вторым антителом, содержащим замены E430G и S440K, соответственно, в человеческом IgG. Как описано в данном документе, первое и второе антитело по всем воплощениям с 1 по 177 необязательно могут содержать дополнительные замены.

Воплощение	Мутации первого антитела	Мутации второго антитела
1	E430G K439E G236R	E430G S440K
2	E430G K439E G236K	E430G S440K
3	E430G K439E G237A	E430G S440K
4	E430G K439E G237T	E430G S440K
5	E430G K439E G237Q	E430G S440K
6	E430G K439E G237R	E430G S440K
7	E430G K439E G237S	E430G S440K
8	E430G K439E G237N	E430G S440K
9	E430G K439E G237D	E430G S440K
10	E430G K439E G237E	E430G S440K

11	E430G K439E G237K	E430G S440K
12	E430G K439E G237V	E430G S440K
13	E430G K439E G237M	E430G S440K
14	E430G K439E G237I	E430G S440K
15	E430G K439EG237L	E430G S440K
16	E430G K439E G237H	E430G S440K
17	E430G K439E G237F	E430G S440K
18	E430G K439EG237Y	E430G S440K
19	E430G K439EG237W	E430G S440K
20	E430G K439E G237P	E430G S440K
21	E430G K439E E269K	E430G S440K
22	E430G K439E K322A	E430G S440K
23	E430G K439E K322E	E430G S440K
24	E430G K439E L234F L235E	E430G S440K
25	E430G K439E L234F L235A	E430G S440K
26	E430G K439E L234F L235Q	E430G S440K
27	E430G K439E L234A L235E	E430G S440K
28	E430G K439E L234A L235A	E430G S440K
29	E430G K439E L234A L235Q	E430G S440K
30	E430G K439E	E430G S440K G236R
31	E430G K439E	E430G S440K G236K
32	E430G K439E	E430G S440K G237A
33	E430G K439E	E430G S440K G237T
34	E430G K439E	E430G S440K G237Q
35	E430G K439E	E430G S440K G237R
36	E430G K439E	E430G S440K G237S
37	E430G K439E	E430G S440K G237N
38	E430G K439E	E430G S440K G237D
39	E430G K439E	E430G S440K G237E
40	E430G K439E	E430G S440K G237K
41	E430G K439E	E430G S440K G237V
42	E430G K439E	E430G S440K G237M
43	E430G K439E	E430G S440K G237I
44	E430G K439E	E430G S440K G237L
45	E430G K439E	E430G S440K G237H
46	E430G K439E	E430G S440K G237F
47	E430G K439E	E430G S440K G237Y
48	E430G K439E	E430G S440K G237W
49	E430G K439E	E430G S440K G237P
50	E430G K439E	E430G S440K E269K
51	E430G K439E	E430G S440K K322A
52	E430G K439E	E430G S440K K322E
53	E430G K439E	E430G S440K L234F L235E
54	E430G K439E	E430G S440K L234F L235A
55	E430G K439E	E430G S440K L234F L235Q
56	E430G K439E	E430G S440K L234A L235E
57	E430G K439E	E430G S440K L234A L235A
58	E430G K439E	E430G S440K L234A L235Q
59	E430G K439E G236R	E430G S440K G237A
60	E430G K439E G236R	E430G S440K K326A

61	E430G K439E G236R	E430G S440K K326W
62	E430G K439E G236R	E430G S440K E333A
63	E430G K439E G236R	E430G S440K E333S
64	E430G K439E G236R	E430G S440K G237A E333S
65	E430G K439E G236R	E430G S440K K326W E333S
66	E430G K439E G236R	E430G S440K K326W E333A
67	E430G K439E G237A	E430G S440K G236R
68	E430G K439E K326A	E430G S440K G236R
69	E430G K439E K326W	E430G S440K G236R
70	E430G K439E E333A	E430G S440K G236R
71	E430G K439E E333S	E430G S440K G236R
72	E430G K439E G237A E333S	E430G S440K G236R
73	E430G K439E K326W E333S	E430G S440K G236R
74	E430G K439E K326W E333A	E430G S440K G236R
75	E430G K439E G237T	E430G S440K G237A
76	E430G K439E G237T	E430G S440K K326A
77	E430G K439E G237T	E430G S440K K326W
78	E430G K439E G237T	E430G S440K E333A
79	E430G K439E G237T	E430G S440K E333S
80	E430G K439E G237T	E430G S440K G237A E333S
81	E430G K439E G237T	E430G S440K K326W E333S
82	E430G K439E G237T	E430G S440K K326W E333A
83	E430G K439E G237A	E430G S440K G237T
84	E430G K439E K326A	E430G S440K G237T
85	E430G K439E K326W	E430G S440K G237T
86	E430G K439E E333A	E430G S440K G237T
87	E430G K439E E333S	E430G S440K G237T
88	E430G K439E G237A E333S	E430G S440K G237T
89	E430G K439E K326W E333S	E430G S440K G237T
90	E430G K439E K326W E333A	E430G S440K G237T
91	E430G K439E G237A	E430G S440K G237A
92	E430G K439E G237A	E430G S440K K326A
93	E430G K439E G237A	E430G S440K K326W
94	E430G K439E G237A	E430G S440K E333A
95	E430G K439E G237A	E430G S440K E333S
96	E430G K439E G237A	E430G S440K G237A E333S
97	E430G K439E G237A	E430G S440K K326W E333S
98	E430G K439E G237A	E430G S440K K326W E333A
99	E430G K439E K326A	E430G S440K G237A
100	E430G K439E K326W	E430G S440K G237A
101	E430G K439E E333A	E430G S440K G237A
102	E430G K439E E333S	E430G S440K G237A
103	E430G K439E G237A E333S	E430G S440K G237A
104	E430G K439E K326W E333S	E430G S440K G237A
105	E430G K439E K326W E333A	E430G S440K G237A
106	E430G K439E G237Q	E430G S440K G237A
107	E430G K439E G237Q	E430G S440K K326A
108	E430G K439E G237Q	E430G S440K K326W
109	E430G K439E G237Q	E430G S440K E333A
110	E430G K439E G237Q	E430G S440K E333S

111	E430G K439E G237Q	E430G S440K G237A E333S
112	E430G K439E G237Q	E430G S440K K326W E333S
113	E430G K439E G237Q	E430G S440K K326W E333A
114	E430G K439E G237A	E430G S440K G237Q
115	E430G K439E K326A	E430G S440K G237Q
116	E430G K439E K326W	E430G S440K G237Q
117	E430G K439E E333A	E430G S440K G237Q
118	E430G K439E E333S	E430G S440K G237Q
119	E430G K439E G237A E333S	E430G S440K G237Q
120	E430G K439E K326W E333S	E430G S440K G237Q
121	E430G K439E K326W E333A	E430G S440K G237Q
122	E430G K439E G237R	E430G S440K G237A
123	E430G K439E G237R	E430G S440K K326A
124	E430G K439E G237R	E430G S440K K326W
125	E430G K439E G237R	E430G S440K E333A
126	E430G K439E G237R	E430G S440K E333S
127	E430G K439E G237R	E430G S440K G237A E333S
128	E430G K439E G237R	E430G S440K K326W E333S
129	E430G K439E G237R	E430G S440K K326W E333A
130	E430G K439E G237A	E430G S440K G237R
131	E430G K439E K326A	E430G S440K G237R
132	E430G K439E K326W	E430G S440K G237R
133	E430G K439E E333A	E430G S440K G237R
134	E430G K439E E333S	E430G S440K G237R
135	E430G K439E G237A E333S	E430G S440K G237R
136	E430G K439E K326W E333S	E430G S440K G237R
137	E430G K439E K326W E333A	E430G S440K G237R
138	E430G K439E G237S	E430G S440K G237A
139	E430G K439E G237S	E430G S440K K326A
140	E430G K439E G237S	E430G S440K K326W
141	E430G K439E G237S	E430G S440K E333A
142	E430G K439E G237S	E430G S440K E333S
143	E430G K439E G237S	E430G S440K G237A E333S
144	E430G K439E G237S	E430G S440K K326W E333S
145	E430G K439E G237S	E430G S440K K326W E333A
146	E430G K439E G237A	E430G S440K G237S
147	E430G K439E K326A	E430G S440K G237S
148	E430G K439E K326W	E430G S440K G237S
149	E430G K439E E333A	E430G S440K G237S
150	E430G K439E E333S	E430G S440K G237S
151	E430G K439E G237A E333S	E430G S440K G237S
152	E430G K439E K326W E333S	E430G S440K G237S
153	E430G K439E K326W E333A	E430G S440K G237S
154	E345K K439E G236R	E345K S440K
155	E345K K439E G236R	E345K S440K G237A
156	E345K K439E G236R	E345K S440K E333S
157	E345K K439E G237Q	E345K S440K
158	E345K K439E G237Q	E345K S440K G237A
159	E345K K439E G237Q	E345K S440K E333S
160	E345R K439E G236R	E345K S440K

161	E345R K439E G236R	E345K S440K G237A
162	E345R K439E G236R	E345K S440K E333S
163	E345R K439E G237Q	E345K S440K
164	E345R K439E G237Q	E345K S440K G237A
165	E345R K439E G237Q	E345K S440K E333S
166	E345K K439E	E345K S440K G236R
167	E345K K439E G237A	E345K S440K G236R
168	E345K K439E E333S	E345K S440K G236R
169	E345K K439E	E345K S440K G237Q
170	E345K K439E G237A	E345K S440K G237Q
171	E345K K439E E333S	E345K S440K G237Q
172	E345R K439E	E345R S440K G236R
173	E345R K439E G237A	E345R S440K G236R
174	E345R K439E E333S	E345R S440K G236R
175	E345R K439E	E345R S440K G237Q
176	E345R K439E G237A	E345R S440K G237Q
177	E345R K439E E333S	E345R S440K G237Q

В следующей таблице представлен предпочтительный список воплощений, описывающий комбинации первого антитела и второго антитела со специфическими заменами. Таким образом, например, воплощение 1 в таблице ниже представляет собой комбинацию первого антитела, содержащего замены в положениях, соответствующих E430G, K439E и G236R, соответственно, в человеческом IgG, со вторым антителом, содержащим замены E430G и S440K, соответственно, в человеческом IgG. Как описано в данном документе, первое и второе антитело по всем воплощениям с 1 по 36 необязательно могут включать дополнительные замены.

Воплощение	Мутации первого антитела	Мутации второго антитела
1	E430G K439E G236R	E430G S440K
2	E430G K439E G237Q	E430G S440K
3	E430G K439E	E430G S440K G236R
4	E430G K439E	E430G S440K G237Q
5	E430G K439E G236R	E430G S440K G237A
6	E430G K439E G236R	E430G S440K E333S
7	E430G K439E G237A	E430G S440K G236R
8	E430G K439E E333S	E430G S440K G236R
9	E430G K439E G237Q	E430G S440K G237A
10	E430G K439E G237Q	E430G S440K E333S
11	E430G K439E G237A	E430G S440K G237Q
12	E430G K439E E333S	E430G S440K G237Q
13	E345K K439E G236R	E345K S440K
14	E345K K439E G236R	E345K S440K G237A
15	E345K K439E G236R	E345K S440K E333S

16	E345K K439E G237Q	E345K S440K
17	E345K K439E G237Q	E345K S440K G237A
18	E345K K439E G237Q	E345K S440K E333S
19	E345R K439E G236R	E345K S440K
20	E345R K439E G236R	E345K S440K G237A
21	E345R K439E G236R	E345K S440K E333S
22	E345R K439E G237Q	E345K S440K
23	E345R K439E G237Q	E345K S440K G237A
24	E345R K439E G237Q	E345K S440K E333S
25	E345K K439E	E345K S440K G236R
26	E345K K439E G237A	E345K S440K G236R
27	E345K K439E E333S	E345K S440K G236R
28	E345K K439E	E345K S440K G237Q
29	E345K K439E G237A	E345K S440K G237Q
30	E345K K439E E333S	E345K S440K G237Q
31	E345R K439E	E345R S440K G236R
32	E345R K439E G237A	E345R S440K G236R
33	E345R K439E E333S	E345R S440K G236R
34	E345R K439E	E345R S440K G237Q
35	E345R K439E G237A	E345R S440K G237Q
36	E345R K439E E333S	E345R S440K G237Q

В одном воплощении первая Fc-область включает замену E430G, K439E и G236R, а вторая Fc-область включает замену E430G и S440K. В другом воплощении первая Fc-область включает замену E430G, K439E и G237Q, а вторая Fc-область включает замену E430G и S440K.

В одном воплощении первая Fc-область включает замену E430G и K439E, а вторая Fc-область включает замену E430G, S440K и G236R. В другом воплощении первая Fc-область включает замену E430G и K439E, а вторая Fc-область включает замену E430G, S440K и G237Q. В одном воплощении первая Fc-область включает замену E430G, K439E и G236R, а вторая Fc-область включает замену E430G, S440K и G237A. В другом воплощении первая Fc-область включает замену E430G, K439E и G236R, а вторая Fc-область включает замену E430G, S440K и E333S. В одном воплощении первая Fc-область включает замену E430G, K439E и G237A, а вторая Fc-область включает замену E430G, S440K и G236R. В другом воплощении первая Fc-область включает замену E430G, K439E и E333S, а вторая Fc-область включает замену E430G, S440K и G236R. В одном воплощении первая Fc-область включает замену E430G, K439E и G237Q, а вторая Fc-область включает замену E430G, S440K и G237A. В другом воплощении первая Fc-область включает замену E430G, K439E и G237Q, а вторая Fc-область включает замену E430G,

S440K и E333S. В одном воплощении первая Fc-область включает замену E430G, K439E и G237A, а вторая Fc-область включает замену E430G, S440K и G237Q. В одном воплощении первая Fc-область включает замену E430G, K439E и E333S, а вторая Fc-область включает замену E430G, S440K и G237Q. В одном воплощении первая Fc-область включает замену E345K, K439E и G236R, а вторая Fc-область включает замену E345K, S440K и E333S. В одном воплощении первая Fc-область включает замену E345R, K439E и G236R, а вторая Fc-область включает замену E345K, S440K и E333S. В одном воплощении первая Fc-область включает замену E345R, K439E и G237Q, а вторая Fc-область включает замену E345K и S440K.

В одном воплощении изобретения первое и/или второе антитело является человеческим, гуманизированным или химерным. В одном воплощении изобретения первое и второе антитела являются человеческими, гуманизированными или химерными. В одном воплощении изобретения первое и второе антитело являются человеческими. В одном воплощении изобретения первое и второе антитело являются гуманизированными. В одном воплощении изобретения первое антитело является человеческим, а второе антитело - гуманизированным. В одном воплощении изобретения первое антитело является гуманизированным, а второе антитело - человеческим.

В одном воплощении изобретения первое и/или второе антитело представляют собой моноклональное антитело. В одном воплощении изобретения первое и второе антитело представляют собой моноклональное антитело. В одном воплощении изобретения первое и второе антитело представляют собой биспецифическое антитело. В одном воплощении первое антитело представляет собой моноклональное антитело, а второе антитело представляет собой биспецифическое антитело. В одном воплощении первое антитело представляет собой биспецифическое антитело, а второе антитело представляет собой моноклональное антитело.

Следует понимать, что воплощения, описанные в данном документе со ссылкой на антитело, относятся к антителу, содержащему Fc-область иммуноглобулина и антигенсвязывающую область, антитело также может быть мультиспецифическим антителом, таким как биспецифическое антитело, имеющем первую Fc-область иммуноглобулина и первую антигенсвязывающую область и второй полипептид или антитело, имеющих вторую Fc-область иммуноглобулина и вторую антигенсвязывающую область.

В одном воплощении изобретения первое и/или второе антитело представляет собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В одном воплощении изобретения первое и второе антитело представляют собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В одном

воплощении изобретения первое и второе антитело представляют собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека. В одном воплощении изобретения первое и второе антитело представляют собой изотип IgG1, IgG2 или IgG4. В одном воплощении изобретения первое и второе антитело представляют собой изотип IgG1 человека, IgG2 или IgG4. В одном воплощении изобретения первое и/или второе антитело представляет собой изотип IgG1. В одном воплощении изобретения первое и/или второе антитело является изотипом IgG1 человека. В одном воплощении изобретения первое и второе антитело представляют собой изотип IgG1. В одном воплощении первое и второе антитело представляют собой изотип IgG2. В одном воплощении изобретения первое и второе антитело представляют собой изотип IgG4. В одном воплощении изобретения первое антитело представляет собой изотип IgG1, а второе антитело представляет собой изотип IgG2. В одном воплощении изобретения первое антитело представляет собой изотип IgG2, а второе антитело представляет собой изотип IgG1.

В одном воплощении изобретения первое антитело включают тяжелую цепь изотипа IgG1. В одном воплощении изобретения второе антитело включает тяжелую цепь изотипа IgG1. В одном воплощении изобретения первое антитело включает тяжелую цепь изотипа IgG2. В одном воплощении изобретения второе антитело включает тяжелую цепь изотипа IgG2. В одном воплощении изобретения первое антитело включает тяжелую цепь изотипа IgG3. В одном воплощении изобретения второе антитело включает тяжелую цепь изотипа IgG3. В одном воплощении изобретения первое антитело включает тяжелую цепь изотипа IgG4. В одном воплощении изобретения второе антитело включает тяжелую цепь изотипа IgG4.

В одном воплощении изобретения первое антитело включает тяжелую цепь изотипа IgG1, а второе антитело включает тяжелую цепь изотипа IgG1.

В предпочтительном воплощении указанное первое антитело включает первую Fc-область изотипа IgG1 человека и/или указанное второе антитело включает вторую Fc-область изотипа IgG1 человека.

В одном воплощении изобретения антитело или первое и/или второе антитело включает первую и/или вторую константную область, содержащую последовательность, выбранную из таблицы 1.

В одном воплощении изобретения антитело или первое и/или второе антитело включает первую и/или вторую константную область, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 63-122, 135-138, 140-145.

В одном воплощении изобретения первое и/или второе антитело включает первую и/или вторую константную область тяжелой цепи, содержащую последовательность,

выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 63-122, 135-138, 140-145, где первая и вторая последовательности тяжелой цепи выбраны независимо из группы.

В одном воплощении изобретения антитело или первое и/или второе антитело включает первую и/или вторую константную область, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 63-122, 135-138 и 140-145, где введено не более 5 дополнительных замен, например, не более 4 дополнительных замен, например, не более 3 дополнительных замен, например, не более 2 дополнительных замен, например, не более 1 дополнительной замены.

В одном воплощении изобретения антитело, например, первое или второе антитело включает константную область, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 84. В одном воплощении изобретения антитело, например, первое или второе антитело включает константную область, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 87. В одном воплощении изобретения антитело, например, первое или второе антитело включает константную область, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 101. В одном воплощении изобретения антитело, например, первое или второе антитело включает константную область, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 107. В одном воплощении изобретения антитело, например, первое или второе антитело включает константную область, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 105. В одном воплощении изобретения антитело, например, первое или второе антитело включает константную область, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 103. В одном воплощении изобретения антитело, например, первое или второе антитело включает константную область, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 85. В одном воплощении изобретения антитело, например, первое или второе антитело включает константную область, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 104. В одном воплощении изобретения антитело, например, первое или второе антитело включает константную область, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 82. В одном воплощении изобретения антитело, например, первое или второе антитело включает константную область, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 66. В одном воплощении изобретения антитело, например, первое или второе антитело включает константную область, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 68. В одном воплощении изобретения антитело, например, первое или второе антитело включает константную область, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 73.

В одном воплощении изобретения первый и второй антигены представляют собой

молекулы, экспонируемые на поверхности клетки. В одном воплощении первый и второй антигены экспрессируются в одной и той же клетке. В другом воплощении первый и второй антигены экспрессируются в одной и той же ткани.

В одном воплощении изобретения первый и второй антигены совместно расположены в клетках или тканях, которые являются клетками-мишенями или тканями-мишенями для заболевания или нарушения, подлежащего лечению. В другом воплощении изобретения первый и второй антигены не идентичны.

В одном воплощении изобретения первое и второе антитело истощают популяцию клеток, экспрессирующих первый и второй антиген.

В одном воплощении изобретения популяция клеток представляет собой опухолевую клетку.

В одном воплощении изобретения популяция клеток представляет собой гематологическую опухолевую клетку или солидную опухолевую клетку.

В одном воплощении изобретения популяция клеток представляет собой лейкоциты, такие как популяция клеток лейкоцитов.

В одном воплощении изобретения популяция клеток представляет собой лимфоцит, такой как популяция лимфоцитов.

В одном воплощении изобретения популяция клеток представляет собой В-клетки, такие как популяция В-клеток. В другом воплощении изобретения популяция клеток является подмножеством популяции В-клеток.

В одном воплощении изобретения популяция клеток представляет собой Т-клетку, такую как популяция Т-клеток. В другом воплощении изобретения популяция клеток представляет собой подмножество популяции Т-клеток. В другом воплощении изобретения популяция клеток представляет собой регуляторную Т-клетку.

В одном воплощении изобретения популяция клеток представляет собой НК-клетку. В другом воплощении изобретения популяция клеток представляет собой клетку-супрессор миелоидного происхождения. В другом воплощении изобретения популяция клеток представляет собой ассоциированный с опухолью макрофаг.

Таким образом, описаны воплощения, в которых первое антитело и второе антитело согласно изобретению используются в качестве лекарственного средства для истощения специфической популяции клеток, экспрессирующих первый и второй антиген, распознаваемый первым и вторым антителом. Таким образом, первое и второе антитело по настоящему изобретению можно использовать для истощения опухолевых клеток, которые экспрессируют первый и второй антиген, распознаваемые первым и вторым антителами, в то время как первое и второе антитело могут не истощать здоровую

ткань, экспрессируя только первое или второй антиген. Первое и второе антитело по настоящему изобретению также могут быть особенно полезными для истощения определенных популяций клеток иммунной системы, таких как определенные подмножества лимфоцитов, например, В-клетки или Т-клетки, или даже подмножества В-клеток или подмножества Т-клеток.

В одном воплощении изобретения антитело представляет собой моноспецифическое антитело, биспецифическое антитело или мультиспецифическое антитело. В одном воплощении изобретения - представляют собой природные антитела.

Антитело, которое имеет природный, например, домен Fc человека также может быть антителом, имеющим другие мутации, отличные от мутаций по настоящему изобретению, такие как, например, мутации, которые влияют на гликозилирование или позволяют антителу быть биспецифическим антителом. Под термином «природное антитело» понимают любое антитело, которое не содержит никаких генетически введенных мутаций. Антитело, которое включает природные модификации, например, различные аллотипы, таким образом, следует понимать как «природное антитело» в смысле настоящего изобретения и, таким образом, можно понимать как исходное антитело. Природное антитело может служить матрицей для, по меньшей мере, трех замен в первом антителе или, по меньшей мере, двух замен во втором антителе согласно настоящему изобретению, обеспечивая тем самым первое и второе антитело по настоящему изобретению. Примером родительского антитела, содержащего замены, отличные от замен по настоящему изобретению, является биспецифическое антитело, описанное в WO2011/131746 (Genmab), с использованием восстанавливающих условий для стимулирования обмена полумолекул двух антител, содержащих IgG4-подобные области СН3, таким образом формируя биспецифические антитела без сопутствующего образования агрегатов. Другие примеры родительских антител включают, без ограничения указанным, биспецифические антитела, такие как гетеродимерные биспецифические вещества: Триомаб (Fresenius); биспецифические IgG1 и IgG2 (Rinat neurosciences Corporation); FcAdp (Regeneron); выступ-во-впадину (Genentech); белки с использованием эффекта электростатического взаимодействия (Amgen, Chugai, Oncomed); SEEDbody (Merck); Azymetric scaffold (Zymeworks); mAb-Fv (Xencor); и LUZ-Y (Genentech). Другие примерные форматы родительских антител включают, без ограничения указанным, антитело дикого типа, полноразмерное антитело или Fc-содержащий фрагмент антитела, человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело или любую их комбинацию.

В одном аспекте изобретения антитело включает Fc-область IgG человека и

антигенсвязывающую область, способную связываться с антигеном, причем указанная Fc-область включает

одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

замену K439E или S440K, при условии, что замена не является S440K, если замена в (a) представляет собой S440Y или S440W, и

одну замену аминокислоты в положении G237 или одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R, G236K, K322A, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q и L235E.

В другом аспекте антитела, содержащее Fc-область IgG человека и антигенсвязывающую область, способную связываться с антигеном, где указанная Fc-область включает

замену K248E и T437R, и

замену K439E или S440K, и

одну замену аминокислоты в положении G237 или P329, или одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R, G236K, K322A, K332E, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q, L235E, K326A, K326W, E333A и E333S.

В одном воплощении изобретения Fc-область включает замену, выбранную из группы, состоящей из: E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W и S440Y.

В одном воплощении изобретения Fc-область включает замену, выбранную из группы, состоящей из: E430G, E345K и E345R.

В одном воплощении изобретения Fc-область включает замену E430G.

В одном воплощении изобретения Fc-область включает не более одной замены в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W.

В одном воплощении изобретения Fc-область включает одну замену, выбранную из группы, состоящей из: G237A, G237T, G237Q, G237R, G237S, G237N, G237D, G237E, G237K, G237V, G237M, G237I, G237L, G237H23, G7237F,, G237W, G237P.

В одном воплощении изобретения Fc-область включает одну замену, выбранную из группы, состоящей из: G237A, G237T, G237S, G237Q, G237R. В одном воплощении изобретения Fc-область включает замену G237Q.

В одном воплощении изобретения Fc-область включает одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R и E269K.

В одном воплощении изобретения Fc-область включает замену G236R.

В одном воплощении изобретения Fc-область включает замену E269K.

В одном воплощении изобретения Fc-область включает замену K322A.

Мишени и способ применения

Первое и/или второе антитело по настоящему изобретению может связываться с мишенью, экспрессируемой на одной и той же клетке. В одном воплощении мишень представляет собой мишень, которая активирует, ингибирует, модулирует и/или регулирует путь передачи сигнала.

Примерами мишеней, которые могут быть особенно подходящими в качестве мишеней согласно настоящему изобретению, являются рецепторы и лиганды клеточной поверхности.

Следующие классы белков также могут быть особенно подходящими в качестве антигенсвязывающей мишени для первого и/или второго антитела согласно изобретению, суперсемейство рецепторов некроза опухоли, GPI-заякоренные белки, липидированные белки, гидролазы (EC 3) и суперсемейство регуляторов, белок, родственный семейству B7, суперсемейство иммуноглобулинов, семейство рецепторов интерлейкинов, интегрины, семейство молекул иммуноглобулиновой адгезии, протеинтирозинфосфатазы рецепторного типа, лектины C-типа, тетраспанины, белки с 4 трансмембранными областями, активирующие лейкоцитарные иммуноглобулиноподобные рецепторы, CC-мотив хемокиновые рецепторы, рецепторы, связанные с G-белком, Toll-подобные рецепторы, рецепторные тирозинкиназы. В одном воплощении изобретения первая и вторая антигенсвязывающие области способны связываться с антигеном-мишенью из одного и того же белкового класса. В одном воплощении изобретения первая и вторая антигенсвязывающие области способны связываться с антигеном-мишенью из разных классов белков.

В одном воплощении изобретения первая антигенсвязывающая область способна связываться с целевым антигеном из белкового класса GPI-заякоренных белков, а вторая антигенсвязывающая область способна связываться с целевым антигеном из белкового класса тетраспанинов. В одном воплощении изобретения первая антигенсвязывающая область способна связываться с целевым антигеном из белкового класса тетраспанинов, а вторая антигенсвязывающая область способна связываться с целевым антигеном из белкового класса GPI-заякоренных белков.

В одном воплощении изобретения первая антигенсвязывающая область способна связываться с целевым антигеном из белкового класса GPI-заякоренных белков, а вторая антигенсвязывающая область способна связываться с целевым антигеном из белкового

класса тетраспанинов. В одном воплощении изобретения первая антигенсвязывающая область способна связываться с целевым антигеном из белкового класса тетраспанинов, а вторая антигенсвязывающая область способна связываться с целевым антигеном из белкового класса GPI-заякоренных белков.

В одном воплощении изобретения первая антигенсвязывающая область способна связываться с целевым антигеном из белкового класса суперсемейства рецепторов некроза опухоли, а вторая антигенсвязывающая область способна связываться с целевым антигеном из белкового класса суперсемейства рецепторов некроза опухоли.

В одном воплощении изобретения первая антигенсвязывающая область способна связываться с целевым антигеном из белкового класса суперсемейства рецепторов некроза опухоли, а вторая антигенсвязывающая область способна связываться с целевым антигеном из белкового класса суперсемейства иммуноглобулинов.

Рецепторы клеточной поверхности включают, например, рецепторы, которые принадлежат к семействам рецепторов, таким как семейство рецепторов гемопоэтических факторов, семейство рецепторов цитокинов, семейство рецепторов тирозинкиназы, семейство рецепторов серин/треонинкиназ, семейство рецепторов TNF, семейство рецепторов, связанных с G-белком, семейство GPI-заякоренных рецепторов, семейство рецепторов тирозинфосфатазы, семейство факторов адгезии и семейство рецепторов гормонов. Доступны различные источники, которые относятся к рецепторам, принадлежащим к этим семействам рецепторов и их характеристикам, которые включают, например, Cooke B. A., King R. J. B., van der Molen H J. ed. *New Comprehensive Biochemistry Vol. 18B «Hormones and their Actions Part П»* pp. 1-46 (1988) Elsevier Science Publishers BV., New York, USA; Patthy L. (1990) *Cell*, 61: 13-14; Ullrich A., et al. (1990) *Cell*, 61: 203-212; Massagul J. (1992) *Cell*, 69: 1067-1070; Miyajima A., et al. (1992) *Annu. Rev. Immunol.*, 10: 295-331; Taga T. and Kishimoto T. (1992) *FASEB J.*, 7: 3387-3396; Fantl W I., et al. (1993) *Annu. Rev. Biochem.*, 62: 453-481; Smith C. A., et al. (1994) *Cell*, 76: 959-962; Flower D R. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, 1422: 207-234; and M. Miyasaka ed., *Cell Technology, supplementary volume, Handbook series, «Handbook for Adhesion Factors»* (1994) (Shujunsha, Tokyo, Japan).

В одном воплощении изобретения антитело включает антигенсвязывающую область, где антигенсвязывающая область связывается с представителем суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR-SF) или суперсемейства рецепторов, связанных с G-белком (GPCR).

В одном воплощении изобретения первое и/или второе антитело связывается с рецептором клеточной поверхности, например, с рецепторами гормонов и рецепторами

цитокинов. Примеры рецепторов цитокинов включают, например, рецептор гемопоэтических факторов, рецептор лимфокина, рецептор фактора роста, рецептор фактора контроля дифференцировки и т.п. Примерами рецепторов цитокинов являются рецептор эритропоэтина (EPO), рецептор тромбопоэтина (TPO), рецептор гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), рецептор макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF), рецептор гранулярного макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), рецептор фактора некроза опухоли (TNF), рецептор интерлейкина-1 (IL-1), рецептор интерлейкина-2 (IL-2), рецептор интерлейкина-3 (IL-3), рецептор интерлейкина-4 (IL-4), рецептор интерлейкина-5 (IL-5), рецептор интерлейкина-6 (IL-6), рецептор интерлейкина-7 (IL-7), рецептор интерлейкина-9 (IL-9), рецептор интерлейкина-10 (IL-10), рецептор интерлейкина-11 (IL-11), рецептор интерлейкина-12 (IL-12), рецептор интерлейкина-13 (IL-13), рецептор интерлейкина-15 (IL-15), рецептор интерферон-альфа (IFN-альфа), рецептор интерферон -бета (IFN-бета), рецептор интерферона-гамма (IFN-гамма), рецептор гормона роста (GH), рецептор инсулина, рецептор фактора пролиферации стволовых клеток (SCF), рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), рецептор фактора роста клеток эпидермиса (EGF), рецептор фактора роста нервов (NGF), рецептор фактора роста фибробластов (FGF), рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGF), рецептор трансформирующего фактора роста-бета (TGF-бета), рецептор фактора подавления миграции лейкоцитов (LIF), рецептор цилиарного нейротрофического фактора (CNTF), рецептор онкостатина М (OSM) и рецептор семейства Notch.

Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей (TNFRSF) представляет собой группу рецепторов, характеризующихся способностью связывать лиганды суперсемейства факторов некроза опухолей (TNFSF) через внеклеточный домен, богатый цистеином. Рецепторы TNF образуют тримерные комплексы в плазматической мембране. TNFRSF включает следующий перечень из 29 белков; TNFR1 (Uniprot P19438), FAS (Uniprot P25445), DR3 (Uniprot Q93038), DR4(Uniprot O00220), DR5 (Uniprot O14763), DR6 (Uniprot O75509), NGFR (Uniprot P08138), EDAR (Uniprot Q9UNE0), DcR1 (Uniprot O14798), DcR2(Uniprot Q9UBN6), DcR3 (Uniprot O95407), OPG (Uniprot O00300), TROY (Uniprot Q9NS68), XEDAR (Uniprot Q9HAV5), LTbR (Uniprot P36941), HVEM (Uniprot Q92956), TWEAKR (Uniprot Q9NP84), CD120b (Uniprot P20333), OX40 (Uniprot P43489), CD40 (Uniprot P25942), CD27 (Uniprot P26842), CD30 (Uniprot P28908), 4-1BB (Uniprot Q07011), RANK (Uniprot Q9Y6Q6), TACI (Uniprot O14836), BLYSR (Uniprot Q96RJ3), BCMA(Uniprot Q02223), GITR (Uniprot Q9Y5U5), RELT (Uniprot Q969Z4).

В одном воплощении изобретения антитело, первое и/или второе антитело

включает антигенсвязывающую область, способную связываться с антигеном, выбранным из группы, состоящей из: DR4, DR5, CD20, CD37, CD52, HLA-DR, CD3 и CD5.

В одном воплощении антигенсвязывающая область способна связываться с DR4. В одном воплощении антигенсвязывающая область способна связываться с DR5. В одном воплощении антигенсвязывающая область способна связываться с CD20. В одном воплощении антигенсвязывающая область способна связываться с CD37. В одном воплощении антигенсвязывающая область способна связываться с CD52. В одном воплощении антигенсвязывающая область способна связываться с HLA-DR. В одном воплощении антигенсвязывающая область способна связываться с CD3. В одном воплощении антигенсвязывающая область способна связываться с CD5.

В одном воплощении изобретения антитело или первое и/или второе антитело включает антигенсвязывающую область, содержащую:

область VH, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 196, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 196, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 198, и область VL, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 200, последовательность CDR2, как указано в: AAT, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 201 [DR4];

область VH, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 50, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 51, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 52, и область VL, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 54, последовательность CDR2, как указано в: FAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 55 [DR5-01-G56T];

область VH, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 57, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 58, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 59, и область VL, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 61, последовательность CDR2, как указано в: RTS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 62 [DR5-05];

область VH, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 36, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 37, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 38, и область VL, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 40, последовательность CDR2, как указано в: DAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 41 [CD20, 7D8];

область VH, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 9, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 10, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 11, и область VL, содержащую последовательность CDR1,

указанную в SEQ ID NO: 13, последовательность CDR2, как указано в: DAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 14 [CD20, 11B8];

область VH, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 43, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 44, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 45, и область VL, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 47, последовательность CDR2, как указано в: VAT, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 48 [CD37];

область VH, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 3, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 4, и область VL, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 6, последовательность CDR2, как указано в: NTN, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 7 [CD52, CAMPATH-1H];

область VH, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 161, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 162, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 163, и область VL, содержащую CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 165, последовательность CDR2, указанная в: LVS, и последовательность CDR3, указанная в SEQ ID NO: 166 [CD52, h2E8];

область VH, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 168, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 169, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 170, и область VL, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 172, последовательность CDR2, как указано в SEQ ID NO: AAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 173 [HLA-DR, hul243];

область VH, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 175, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 176, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 177, и область VL, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 179, последовательность CDR2, указанную в: DNN, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 180 [HLA-DR, 1D09C3];

область VH, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 182, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 183, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 184, и область VL, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 186, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: DTS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 187 [CD3, huCLB T3/4];

область VH, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 189, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 190, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 191, и область VL, содержащую последовательность CDR1,

указанную в SEQ ID NO: 193, последовательность CDR2, указанную в: ATS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 194 [CD5].

В одном аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей первое и второе антитело, где первое антитело включает первую антигенсвязывающую область и первую Fc-область согласно любому воплощению, раскрытому в данном документе, а второе антитело включает вторую антигенсвязывающую область. и вторую Fc-область согласно любому аспекту или воплощению, раскрытому в данном документе.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей первое и второе антитело, где первое антитело включает первую антигенсвязывающую область, способную связываться с первым антигеном, и первую Fc-область IgG человека, и второе антитело включает вторую антигенсвязывающую область, способную связываться со вторым антигеном, и вторую Fc-область IgG человека, причем указанная первая Fc-область включает

одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

замену K439E или S440K, при условии, что замена не является S440K, если замена в (a) представляет собой S440Y или S440W, и

одну замену аминокислоты в положении G237 или одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R, G236K, K322A, E269K, K322E, P329R, L234A, L234F, L235A, L235Q и L235E;

а указанная вторая Fc-область включает

одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

замену K439E или S440K, при условии, что замена не является S440K, если замена в (d) представляет собой S440Y или S440W, и

одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: K326A, K326W, E333A и E333S, если первая Fc-область включает замену K322E или P329R,

где первая Fc-область имеет замену K439E, а вторая Fc-область имеет замену S440K, или первая Fc-область имеет замену S440K, а вторая Fc-область имеет замену K439E, где положения аминокислот соответствуют IgG1 человека согласно системе нумерации EU.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает композицию, содержащую первое и второе антитело, где первое антитело включает первую антигенсвязывающую

область, способную связываться с первым антигеном, и первую Fc-область IgG человека, а второе антитело включает вторую антигенсвязывающую область, способную связываться со вторым антигеном, и вторую Fc-область IgG человека, где указанная первая Fc-область включает

одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

замену K439E или S440K, при условии, что замена не является S440K, если замена в (a) представляет собой S440Y или S440W, и

одну замену аминокислоты в положении G237 или одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R, G236K, K322A, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q и L235E;

а указанная вторая Fc-область включает

одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

замену K439E или S440K при условии, что замена не является S440K, если замена в (d) представляет собой S440Y или S440W,

где первая Fc-область имеет замену K439E, а вторая Fc-область имеет замену S440K или первая Fc-область имеет замену S440K, а вторая Fc-область имеет замену K439E,

где положения аминокислот соответствуют IgG1 человека в соответствии с системой нумерации EU.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает композицию, содержащую первое и второе антитело, где первое антитело включает первую антигенсвязывающую область, способную связываться с первым антигеном, и первую Fc-область IgG человека, а второе антитело включает вторую антигенсвязывающую область, способную связываться со вторым антигеном, и вторую Fc-область IgG человека, где указанная первая Fc-область включает

одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

замену K439E или S440K, при условии, что замена не является S440K, если замена в (a) представляет собой S440Y или S440W, и

одну замену аминокислоты в положении P329 или замену K322E;

а указанная вторая Fc-область включает

одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

замену K439E или S440K, при условии, что замена не является S440K, если замена в (d) представляет собой S440Y или S440W, и

одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: K326A, K326W, E333A и E333S,

где первая Fc-область имеет замену K439E, а вторая Fc-область имеет замену S440K или первая Fc-область имеет замену S440K, а вторая Fc-область имеет замену K439E,

где положения аминокислот соответствуют IgG1 человека в соответствии с системой нумерации EU.

В одном воплощении изобретения композиция, содержащая первую и вторую Fc-область, включает замену, выбранную из группы, состоящей из: E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W и S440Y.

В одном воплощении изобретения композиция, содержащая первую и вторую Fc-область, включает замену, выбранную из группы, состоящей из: E430G, E345K и E345R.

В одном воплощении изобретения композиция, содержащая первую и вторую Fc-область, включает замену E430G.

В одном воплощении изобретения композиция, содержит первую Fc-область, которая включает одну замену, выбранную из группы, состоящей из: G237A, G237T, G237Q, G237R, G237S, G237N, G237D, G237E, G237K, G237V, G237M, G237I, G237L, G237H, G237F, G237Y, G237W и G237P.

В одном воплощении изобретения композиция, содержит первую Fc-область, которая включает одну замену, выбранную из группы, состоящей из: G237A, G237T, G237Q, G237R и G237S.

В одном воплощении изобретения композиция, содержит первую Fc-область, которая включает одну замену, выбранную из группы, состоящей из: G237A, G237T, G237Q и G237R.

Композиция по любому из пп. 43-50, отличающаяся тем, что первая Fc-область включает замену G237Q.

Композиция по любому из пп. 43-50, отличающаяся тем, что первая Fc-область включает замену G237T.

В одном воплощении изобретения композиция, содержащая первую Fc-область,

содержит одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R и G236K.

В одном воплощении изобретения композиция, содержащая первую Fc-область, содержит одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R, G236K и E269K. В одном воплощении изобретения композиция, содержащая первую Fc-область, содержит одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R и E269K. В одном воплощении изобретения композиция, содержит первую Fc-область, которая включает замену G263R или G236K.

В одном воплощении изобретения композиция, содержит первую Fc-область, которая включает одну замену, выбранную из группы, состоящей из: K322E и K322A.

В одном воплощении изобретения композиция, содержит первую Fc-область, которая включает замену P329R.

В одном воплощении изобретения композиция, содержит первую Fc-область, которая включает замену G236R.

В одном воплощении изобретения композиция, содержит первую Fc-область, которая включает одну замену аминокислоты в положении P329.

В одном воплощении изобретения композиция, содержит первую Fc-область, которая включает одну замену, выбранную из группы, состоящей из: P329R, P329A, P329T, P329Q, P329R, P329S, P329N, P329D, P329E, P329K, P329V, P329M, P329I, P329L, P329H, P329F, P329Y, P329W и P329P.

В одном воплощении изобретения композиция, содержит первую Fc-область, которая включает одну замену, выбранную из группы, состоящей из: P329R, P329K, P329E, P329D и P329A.

В одном воплощении изобретения композиция, содержит первую Fc-область, которая включает замену P329R.

В одном воплощении изобретения композиция, содержит первую Fc-область, которая включает замену K322A.

В одном воплощении изобретения композиция, содержит первую Fc-область, которая включает замену E269K.

В одном воплощении изобретения композиция, содержит вторую Fc-область, которая включает одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G237A, K326A, K326W, E333A и E333S.

В одном воплощении изобретения композиция, содержит вторую Fc-область, которая включает одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: K326A, K326W, E333A и E333S.

В одном воплощении изобретения композиция, содержит вторую Fc-область, которая включает одну замену, выбранную из группы, состоящей из: K326A, K326W, E333A и E333S.

В одном воплощении изобретения композиция, содержит вторую Fc-область, которая включает замену G237A.

В одном воплощении изобретения композиция, содержит вторую Fc-область, которая включает замену K326A.

В одном воплощении изобретения композиция, содержит вторую Fc-область, которая включает замену E333S.

В одном воплощении изобретения композиция, содержит вторую Fc-область, которая включает две замены, выбранные из группы, состоящей из: K326A, K326W, E333A и E333S.

В одном воплощении изобретения композиция, содержит вторую Fc-область, которая включает замену K326W и E333S.

В одном воплощении изобретения композиция, содержит вторую Fc-область, которая включает замену K326A и E333A.

В одном воплощении изобретения композиция, содержит вторую Fc-область, которая включает замену G237A и E333S.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция, содержащая первое и второе антитело, присутствует в композиции в молярном соотношении от 1:50 до 50:1, таким как молярное соотношение 1:1, молярное соотношение 1:2, молярное соотношение 1:3, молярное соотношение 1:4, молярное соотношение 1:5, молярное соотношение 1:6, молярное соотношение 1:7, молярное соотношение 1:8, молярное соотношение 1:9, 1:10, молярное соотношение 1:15, молярное соотношение 1:20, молярное соотношение 1:25, молярное соотношение 1:30, молярное соотношение 1:35, молярное соотношение 1:40, 1:45, молярное соотношение, молярное соотношение 1:50, молярное соотношение 50:1, молярное соотношение 45:1, молярное соотношение 40:1, молярное соотношение 35:1, молярное соотношение 30:1, молярное соотношение 25:1, молярное соотношение 20:1, молярное соотношение 15:1, молярное соотношение 10:1, молярное соотношение 9:1, молярное соотношение 8:1, молярное соотношение 7:1, молярное соотношение 6:1, молярное соотношение 5:1, молярное соотношение 4:1, молярное соотношение 3:1, молярное соотношение 2:1.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция, содержащая первое антитело и второе антитело, присутствует в композиции в молярном соотношении около от 1:50 до 50:1, таким как молярное соотношение около от 1:40 до 40:1, например,

молярное соотношение от около 1:30 до 30:1, такое как молярное соотношение от около 1:20 до 20:1, такое как молярное соотношение от около 1:10 до 10:1, такое как молярное соотношение около от 1: 9 до 9:1, такое как молярное соотношение около от 1: 5 до 5: 1.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция, содержащая первое и второе антитело и/или любой дополнительный полипептид, присутствует в композиции в эквимолярном соотношении.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция согласно любому аспекту или воплощению представляет собой фармацевтическую композицию.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу истощения популяции клеток, экспрессирующих первый антиген и второй антиген, который включает контакт указанной популяции клеток с первым и вторым антителом или композицией в соответствии с любым первым и вторым антителом или композицией, как определено в данном документе.

В одном воплощении настоящего изобретения популяция клеток представляет собой популяцию опухолевых клеток, такую как популяция гематологических опухолевых клеток или популяция солидных опухолевых клеток.

В одном воплощении изобретения популяция клеток присутствует в крови.

В одном воплощении изобретения популяция клеток представляет собой лейкоциты, такие как популяция клеток лейкоцитов.

В одном воплощении изобретения популяция клеток представляет собой подмножество популяции лейкоцитарных клеток.

В одном воплощении изобретения популяция клеток представляет собой популяцию лимфоцитов.

В одном воплощении изобретения популяция клеток представляет собой популяцию В-клеток. В одном воплощении изобретения популяция клеток является подмножеством популяции В-клеток.

В одном воплощении изобретения популяция клеток представляет собой популяцию Т-клеток. В одном воплощении изобретения популяция клеток представляет собой подмножество популяции Т-клеток. В одном воплощении изобретения популяция клеток представляет собой регуляторную Т-клетку, такую как популяция регуляторных Т-клеток.

В одном воплощении изобретения популяция клеток представляет собой популяцию НК-клеток.

В одном воплощении изобретения клеточная популяция представляет собой супрессорную клетку миелоидного происхождения.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ

Первое и второе антитело, биспецифические антитела или композиции в соответствии с любым аспектом или воплощением настоящего изобретения можно использовать в качестве лекарственного средства, то есть для терапевтического применения.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает первое и второе антитело или композицию согласно любому аспекту или воплощению, раскрытым в данном документе, для применения в качестве лекарственного средства.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает антитело или композицию в соответствии с любым аспектом или воплощением, раскрытым в данном документе, для применения при лечении рака, аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания или инфекционного заболевания.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего заболеванием, включающему введение индивиду эффективного количества первого и второго антитела или композиции согласно любому аспекту или воплощению, раскрытым в данном документе.

В одном аспекте изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего заболеванием, включающему введение указанному индивиду эффективного количества первого и второго антитела в соответствии с любым аспектом или воплощением, описанным в данном документе, или эффективного количества композиции в соответствии с любым аспектом или воплощением, описанным в данном документе.

В одном воплощении изобретения заболевание выбрано из группы: рака, аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания и инфекционного заболевания.

В одном воплощении изобретения способ включает введение дополнительного терапевтического агента.

В одном воплощении изобретения способ согласно любому аспекту или воплощению, раскрытым в данном документе, относится к дальнейшему введению дополнительного терапевтического агента.

В одном воплощении изобретения дополнительный терапевтический агент представляет собой один или несколько противоопухолевых агентов, выбранных из группы, состоящей из химиотерапевтических средств (включая, без ограничения указанным, паклитаксел, темозоломид, цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, иринотекан, доксорубицин, гемцитабин, 5-фторурацил, пеметрексед), ингибиторы киназы (включая, без ограничения указанным, сорафениб, сунитиниб или эверолимус), агенты,

модулирующие апоптоз (включая, без ограничения указанным, рекомбинантный человеческий TRAIL или биринапант), ингибиторы RAS, ингибиторы протеасом (включая, без ограничения указанным, бортезомиб), ингибиторы гистондеацетилазы (включая, без ограничения указанным, вориностаат), нутрицевтики, цитокины (включая, без ограничения указанным, IFN- γ), антитела или миметики антител (включая, без ограничения указанным, анти-EGFR, анти-IGF-1R, анти-VEGF, анти-CD20, анти-CD38, анти-HER2, анти-PD-1, анти-PD-L1, анти-CTLA4, анти-CD40, анти-CD137, анти-GITR антитела и миметики антител), конъюгаты антитело-лекарственное средство.

НАБОРЫ

Следует понимать, что воплощения, описанные ниже со ссылкой на первое и второе антитело, относятся к антителам, содержащим Fc-область иммуноглобулина и антигенсвязывающую область.

Изобретение также относится к набору частей для одновременного, отдельного или последовательного применения в терапии, содержащему первое и второе антитела, как описано в данном документе. Кроме того, такие первый и второй могут быть получены любым способом, описанным в данном документе.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к набору, содержащему антитело или композицию в соответствии с любым аспектом или воплощением, описанным в данном документе, где указанные первое и второе антитело или композиция находятся в одном или нескольких контейнерах, таких как флаконы.

В одном воплощении настоящего изобретения набор частей включает первое и второе антитело или композицию согласно любому аспекту или воплощению, описанному в данном документе, для одновременного, отдельного или последовательного использования в терапии.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению первого и второго антитела, композиции или набора частей в соответствии с любым из воплощений, описанных в данном документе, для применения в диагностическом способе.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к диагностическому способу, включающему введение первого и второго антитела, композиции или набора частей в соответствии с любыми вариантами осуществления, описанными в настоящем документе, по меньшей мере, в часть тела человека или другого млекопитающего.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению первого и второго антитела, композиции или набора частей в соответствии с любым из воплощений, описанных в данном документе, для визуализации, по меньшей мере, части тела человека или другого млекопитающего.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу визуализации, по меньшей мере, части тела человека или другого млекопитающего, включающему введение первого и второго антитела, композиции или набора частей в соответствии с любыми вариантами осуществления в настоящем документе. описано.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ПРИМЕНЕНИЯ

Следует понимать, что воплощения, описанные ниже со ссылкой на первое и второе антитело, относятся к первому и второму антителу, каждое из которых содержит Fc-область иммуноглобулина и антигенсвязывающую область.

В дополнительном аспекте изобретение относится к первому и второму антителу по изобретению, как описано выше, для применения в качестве лекарственного средства, в частности, для применения в качестве лекарственного средства для лечения заболеваний или нарушений. Примеры таких заболеваний и нарушений включают, без ограничения указанным, рак, аутоиммунные заболевания, воспалительные заболевания, инфекционные заболевания, бактериальные, вирусные или грибковые инфекции.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к первому и второму антителу, биспецифическим антителам, композициям и набору частей, описанным в данном документе, для лечения заболевания, такого как рак.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания человека, включающему введение первого и второго антитела, композиции или набора частей, описанных в данном документе.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака у человека, включающему введение первого и второго антитела, композиции или набора.

«Лечение» обозначает введение эффективного количества терапевтически активного соединения по настоящему изобретению с целью облегчения, улучшения, купирования или устранения (излечения) симптомов болезненных состояний.

«Эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» обозначает количество, эффективное в такой дозировке и в течение таких периодов времени, которые необходимы для достижения искомого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество антитела может варьировать в соответствии с такими факторами, как состояние заболевания, возраст, пол и вес индивидуума, а также способность антитела вызывать искомый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также представляет собой такое количество, в котором терапевтически полезные эффекты превышают любые токсические или вредные эффекты антитела или части антитела.

ДОЗИРОВКИ

Следует понимать, что воплощения, описанные ниже со ссылкой на антитело, относятся к антителу, содержащему Fc-область иммуноглобулина и антигенсвязывающую область, антитело также может быть мультиспецифическим антителом, таким как биспецифическое антитело, имеющее первую Fc-область иммуноглобулина и первую антигенсвязывающую область и второй полипептид или антитело, имеющие вторую Fc-область иммуноглобулина и вторую антигенсвязывающую область.

Эффективные дозировки и режимы дозирования антитела зависят от заболевания или состояния, подлежащего лечению, и могут быть определены специалистами в данной области. Типичный неограничивающий интервал для терапевтически эффективного количества соединения по настоящему изобретению составляет около 0,1-100 мг/кг, как например, около 0,1-50 мг/кг, например, около 0,1-20 мг/кг, как например, около 0,1-10 мг/кг, например, около 0,5, около 0,3, около 1, около 3, около 5, или около 8 мг/кг.

Антитела настоящего изобретения также могут быть введены в комбинированной терапии, например, вместе с другими терапевтическими агентами, релевантными в отношении подвергаемого лечению заболевания или состояния. Соответственно, в одном воплощении, антитело-содержащий медикамент предназначен для комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами, такими как, цитотоксические, химиотерапевтические или антиангиогенные агенты. Такое объединенное введение может быть одновременным, отдельным или последовательным.

В дополнительном воплощении настоящее изобретение обеспечивает способ лечения или профилактики заболевания, такого как рак, который включает введение объекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества варианта или фармацевтической композиции настоящего изобретения в комбинации с лучевой терапией и/или хирургией.

Способ получения

Следует понимать, что воплощения, описанные ниже со ссылкой на антитело, относятся к антителу, содержащему Fc-область иммуноглобулина и антигенсвязывающую область, антитело также может быть мультиспецифическим антителом, имеющим первую Fc-область иммуноглобулина и первая антигенсвязывающая область и второе антитело, имеющее вторую Fc-область иммуноглобулина и вторую антигенсвязывающую область.

В изобретении также предлагаются выделенные нуклеиновые кислоты и векторы, кодирующие вариант по любому из аспектов, описанных выше, а также векторы и экспрессирующие системы, кодирующие данные варианты. Подходящие нуклеотидные конструкторы, векторы и экспрессирующие системы для антител и их вариантов известны в

данной области и описаны в Примерах. В воплощениях, в которых вариантное антитело включает не только тяжелую цепь (или ее Fc-содержащий фрагмент), но также легкую цепь, нуклеотидные последовательности, кодирующие части тяжелой и легкой цепи, могут присутствовать на одинаковых или разных нуклеиновых кислотах или векторах.

В изобретении также предлагается способ получения, в клетке-хозяине, антитела по любому из аспектов, описанных выше, где указанный полипептид или антитело включает, по меньшей мере, Fc-область тяжелой цепи, где указанный способ включает следующие стадии:

- а) обеспечения нуклеотидного конструкта, кодирующего указанную Fc-область указанного варианта,
- б) экспрессии указанной нуклеотидной конструкции в клетке-хозяине, и
- с) извлечения указанного антительного варианта из клеточной культуры указанной клетки-хозяина.

В некоторых воплощениях антитело представляет собой тяжелую цепь антитела. В большинстве воплощений, однако антитело также будет содержать легкую цепь и таким образом указанная клетка-хозяин дополнительно экспрессирует конструкт, кодирующий легкую цепь, либо на этом же, либо на другом векторе.

Клетки-хозяева, подходящие для рекомбинантной экспрессии антител, хорошо известны в данной области и включают клетки CHO, HEK-293, Expi293, PER-C6, NS/0 и Sp2/0. В одном воплощении указанная клетка-хозяин представляет собой клетку, которая способна к Asn-связанному гликозилированию белков, например, эукариотическая клетка, такая как клетка млекопитающего, например, человеческая клетка. В дополнительном воплощении, указанная клетка-хозяин является нечеловеческой клеткой, которая генетически сконструирована для выработки гликопротеинов, имеющих похожее на человеческое или человеческое гликозилирование. Примерами таких клеток являются генетически модифицированные *Pichia pastoris* (Hamilton et al., *Science* 301 (2003) 1244-1246; Potgieter et al., *J. Biotechnology* 139 (2009) 318-325) и генетически модифицированные *Lemna minor* (Cox et al. др., *Nature Biotechnology* 12 (2006) 1591-1597).

В одном воплощении указанная клетка-хозяин представляет собой клетку, которая не способна эффективно удалять С-концевой остаток лизина K447 из тяжелой цепи антитела. Например, Таблица 2 в Liu et al. (2008) *J Pharm Sci* 97: 2426 (включено в данный документ ссылкой) перечисляет несколько таких систем получения антител, например, Sp2/0, NS/0 или трансгенную молочную железу (козы), где достигнуто частичное удаление С-концевых лизинов. В одном воплощении клетка-хозяин является клеткой-хозяином с измененной машинерией гликозилирования. Такие клетки были описаны в

данной области и могут быть использованы в качестве клеток-хозяев, в которые экспрессируются варианты изобретения для получения антитела с измененным гликозилированием. См. например, Shields, R.L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-1, а также EP1176195; WO03/035835; и WO99/54342. Дополнительные способы получения сконструированных гликоформ известны в данной области и включают, без ограничения указанным, описанные в Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al, 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473), US6602684, WO00/61739A1; WO01/292246A1; WO02/311140A1; WO 02/30954A1; Potelligent™ technology (Biowa, Inc. Принстон, Нью-Джерси); GlycoMAb™ glycosylation engineering technology (GLYCART biotechnology AG, Цюрих, Швейцария); US 20030115614; Okazaki et al., 2004, JMB, 336: 1239-49.

Изобретение также относится к антителу, полученному или получаемому способом изобретения, описанным выше.

В дополнительном аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, способной продуцировать антитело по изобретению. В одном воплощении клетка-хозяин была трансформирована или трансфицирована нуклеотидным конструктом изобретения.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не должны толковаться как ограничивающие.

Таблица 1. СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO.	Название		Последовательность
SEQ ID NO 1	VH CAMPATH-1H		QVQLQESGPGLV RPSQTL SLTCTVSGFTFTDFYM NWVRQPPGRGLEWIGF <u>IRDKAKGYTTEYNPSVK</u> GRVTMLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYC <u>AREGHTAAPFDYWGQGS</u> LVTVSS
SEQ ID NO 2	VH CAMPATH-1H CDR1		GFTFTDFY
SEQ ID NO 3	VH CAMPATH-1H CDR2		IRDKAKGYTT
SEQ ID NO 4	VH CAMPATH-1H CDR3		AREGHTAAPFDY
SEQ ID NO 5	VL CAMPATH-1H		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAS <u>QNIDKYL</u> N WYQQKPGKAPKLLIYNTNINLQTVPSRFSGSGSG TDFFTISSLPEDIATYYC <u>LOHISRPR</u> TFGQGTK VEIK
SEQ ID NO 6	VL CAMPATH-1H CDR1		QNIDKY

	VL CAMPATH- 1H CDR2		NTN
SEQ ID NO 7	VL CAMPATH- 1H CDR3		LQHISRPRT
SEQ ID NO 8	VH CD20- 11B8		EVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCTGSG <u>GFTFSYHA</u> MHWVRQAPGKGLEWVSI <u>IGTGGVT</u> YYADSVKGRFTISRDNVKNLSYLQMNLSRAEDMAVYYC <u>ARD</u> <u>YYGAGSFYDGLYGMDV</u> WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO 9	VH CD20- 11B8 CDR1		GFTFSYHA
SEQ ID NO 10	VH CD20- 11B8 CDR2		IGTGGVT
SEQ ID NO 11	VH CD20- 11B8 CDR3		ARDYYGAGSFYDGLYGMDV
SEQ ID NO 12	VL CD20- 11B8		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS <u>QSVSSY</u> LAW YQQKPGQAPRLLIY <u>DAS</u> NRATGIPARFSGSGSGTD FTLTISLEPEDFAVYYC <u>QQRSDWPLT</u> FGGGGTKV EIK
SEQ ID NO 13	VL CD20- 11B8 CDR1		QSVSSY
	VL CD20- 11B8 CDR2		DAS
SEQ ID NO 14	VL CD20- 11B8 CDR3		QQRSDWPLT
SEQ ID NO 15	VH gp120- b12		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQAS <u>GYRFSNFV</u> IHWVRQAPGQRFQEWGMW <u>INPYNGN</u> KEFSAKFQ DRVTFTADTSANTAYMELRSLRSADTAVYYC <u>AR</u> <u>VGPYSWDDSPQDNYYMDV</u> WGKGTTVIVSS
SEQ ID NO 16	VH gp120- b12 CDR1		GYRFSNFV
SEQ ID NO 17	VH gp120- b12 CDR2		INPYNGNK
SEQ ID NO 18	VH gp120- b12 CDR3		ARVGPYSWDDSPQDNYYMDV
SEQ ID NO 19	VL gp120- b12		EIVLTQSPGTLSPGERATFSCRSS <u>HSIRSRR</u> VA WYQHKGQAPRLVIH <u>GVS</u> NRASGISDRFSGSGSGT DFTLTITRVEPEDFALYYC <u>QVYGASSY</u> TFGQGT KLERK
SEQ ID NO 20	VL gp120- b12 CDR1		HSIRSRR
	VL gp120- b12 CDR2		GVS
SEQ ID NO 21	VL gp120- b12-CDR3		QVYGASSYT
SEQ ID NO 22	константная область HC IgG1m(f) человека		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK

			CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 23	константная область HC IgG1m(z) человека		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK <u>K</u> VEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 24	константная область HC IgG1m(a) человека		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK <u>P</u> VEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR <u>D</u> ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 25	константная область HC IgG1m(x) человека		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK <u>P</u> VEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHE <u>G</u> LHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 26	константная область HC IgG1m(f) человека		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK <u>R</u> VEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 27	константная область HC IgG1m(f)- E345K человека		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK <u>R</u> VEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR <u>K</u> PQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN

			NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 28	константная область HC IgG1m(f)- E345R человека		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR <u>R</u> PQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 29	константная область HC IgG1m(f)- K439E человека		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQ <u>E</u> SLSLSPGK
SEQ ID NO 30	константная область HC IgG1m(f)- S440K человека		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQK <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 31	константная область HC IgG2 человека		ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVNHDHPSNTKVDKTVKCC VECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 32	константная область HC IgG3 человека		ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYTCNVNHDHPSNTKVDKRVKPKTP LGDTHHTCPRCPEPKSCDTPPCPRCPEPKSCDTPP PCPRCPEPKSCDTPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPVTTCVVVDVSHEDPEVQFKWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV

			EWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 33	константная область HC IgG4 человека		ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
SEQ ID NO 34	константная область LC каппа человека		RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO 35	VH CD20-7D8		EVQLVESGGGLVQPDRSLRLSCAAS <u>GFTFHDYA</u> MHWVRQAPGKGLEWVST <u>ISWNSGTI</u> GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAK <u>DIQYGNYYYYGMDV</u> WGQGTITVTVSS
SEQ ID NO 36	VH CD20-7D8 CDR1		GFTFHDYA
SEQ ID NO 37	VH CD20-7D8 CDR2		ISWNSGTI
SEQ ID NO 38	VH CD20-7D8 CDR3		AKDIQYGNYYYYGMDV
SEQ ID NO 39	VL CD20-7D8		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY <u>DASN</u> RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYC <u>QQRSNWPIT</u> FGQGTRLEIK
SEQ ID NO 40	VL CD20-7D8 CDR1		QSVSSY
	VL CD20-7D8 CDR2		DAS
SEQ ID NO 41	VL CD20-7D8 CDR3		QQRSNWPIT
SEQ ID NO 42	VH CD37-37-3		QVQVKESGPGLVAPSQSL SITCTVSG <u>GFSLTTS</u> GVSWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGSTNYHSALKSRLSIKKDHSKSKVFLKLNSLQTDDTATYYCAKGGYSLAHWGQGLTVTVSA
SEQ ID NO 43	VH CD37-37-3 CDR1		GFSLTTS
SEQ ID NO 44	VH CD37-37-3 CDR2		IWGDGST
SEQ ID NO 45	VH CD37-37-3 CDR3		AKGGYSLAH
SEQ ID NO 46	VL CD37-37-3		DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIRSNLAWYQQKQKSPQLLVN <u>VAT</u> NLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGTYYC <u>QH</u> YWGTTWTFGGG TKLEIK
SEQ ID	VL CD37-		ENIRSN

NO 47	37-3 CDR1		
	VL CD37- 37-3 CDR2		VAT
SEQ ID NO 48	VL CD37- 37-3 CDR3		QH YWGTTWT
SEQ ID NO 49	VH hDR5- 01-G56T		EVQLQQSGAEVVKPGASVKLSCKAS <u>GFNIKDTFI</u> HWVKQAPGQGLEWIGR <u>IDPANTNT</u> KYDPKFKQ GK ATITTDTSNTAYMELSSLRSED TAVYYC <u>VRGLY</u> <u>TYYFDY</u> WGQGLTVTVSS
SEQ ID NO 50	VH hDR5- 01-G56T CDR1		GFNIKDTF
SEQ ID NO 51	VH hDR5- 01-G56T CDR2		IDPANTNT
SEQ ID NO 52	VH hDR5- 01-G56T CDR3		VRGLYTYYFDY
SEQ ID NO 53	VL hDR5- 01-G56T		EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS <u>QISISNNLHW</u> YQQKPGQAPRLLIK <u>FAS</u> QSITGIPARFSGSGSGTEF TLTISSLQSEDFAVYYC <u>QOQNSWPYTF</u> GQGGTKLE IK
SEQ ID NO 54	VL hDR5- 01-G56T CDR1		QISISNN
	VL hDR5- 01-G56T CDR2		FAS
SEQ ID NO 55	VL hDR5- 01-G56T CDR3		QOQNSWPYT
SEQ ID NO 56	VH hDR5-05		QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKAS <u>GFNIKDTH</u> MHWVRQAPGQRLEWIGR <u>IDPANGNTEYDQKFKQ</u> GRVTITVDTSASTAYMELSSLRSED TAVYYC <u>AR</u> <u>WGTVNYFAY</u> WGQGLTVTVSS
SEQ ID NO 57	VH hDR5-05 CDR1		GFNIKDTH
SEQ ID NO 58	VH hDR5-05 CDR2		IDPANGNT
SEQ ID NO 59	VH hDR5-05 CDR3		ARWGTVNYFAY
SEQ ID NO 60	VL hDR5-05		DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSA <u>SSVS</u> MYWY QQKPGKAPKPWIY <u>RTS</u> NLASGVPSRFSGSGSGTD FTLISSLQPEDFATYYC <u>QOYHSYPPT</u> FGGGTKV EIK
SEQ ID NO 61	VL hDR5-05 CDR1		SSVS
	VL hDR5-05 CDR2		RTS
SEQ ID NO 62	VL hDR5-05 CDR3		QOYHSYPPT
SEQ ID	константная	констант-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE

NO 63	область HC IgG1m(f)- A327K- E430G человека	ная область HC IgG1m(f)- A327K- E430G человека	PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNK <u>K</u> LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 64	константная область HC IgG1m(f)- E345A- K439E- G236R человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G236R- E345A- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSC DKTHTCPPCPAPELL <u>R</u> GPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR <u>A</u> PQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQ <u>E</u> SLSLSPGK
SEQ ID NO 65	константная область HC IgG1m(f)- E345A- S440K- G237A человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G237A- E345A- S440K человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSC DKTHTCPPCPAPELL <u>G</u> APSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR <u>A</u> PQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQ <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 66	константная область HC IgG1m(f)- E345K- K439E- G236R человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G236R- E345K- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSC DKTHTCPPCPAPELL <u>R</u> GPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR <u>K</u> PQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQ <u>E</u> SLSLSPGK
SEQ ID NO 67	константная область HC IgG1m(f)- E345K- K439E- K322A человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- K322A- E345K- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK C <u>A</u> VSNKALPAPIEKTISKAKGQPR <u>K</u> PQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQ <u>E</u> SLSLSPGK
SEQ ID NO 68	константная область HC IgG1m(f)-	констант- ная область	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSC

	E345K-S440K-E333S человека	HC IgG1m(f)- E333S- E345K- S440K человека	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPI <u>S</u> KTISKAKGQPR <u>K</u> PQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQK <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 69	константная область HC IgG1m(f)- E345Q- K439E- G236R человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G236R- E345Q- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELL <u>R</u> GPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR <u>Q</u> PQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQ <u>E</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 70	константная область HC IgG1m(f)- E345Q- S440K- G237A человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G237A- E345Q- S440K человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELL <u>G</u> APSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR <u>Q</u> PQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQK <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 71	константная область HC IgG1m(f)- E345R- E430G- K439E- G236R человека	константн ая область HC IgG1m(f)- G236R- E345R- E430G- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELL <u>R</u> GPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR <u>R</u> PQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQ <u>E</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 72	константная область HC IgG1m(f)- E345R- E430G- S440K- E333S человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- E333S- E345R- E430G- S440K человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPI <u>S</u> KTISKAKGQPR <u>R</u> PQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQK <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 73	константная область HC IgG1m(f)- E345R- K439E-	констант- ная область HC IgG1m(f)-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELL <u>R</u> GPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

	G236R человека	G236R- E345R- K439E человека	KTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR <u>R</u> PQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQ <u>E</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 74	константная область HC IgG1m(f)- E345R- K439E- K322A человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- K322A- E345R- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYK C <u>A</u> VSNKALPAPIEKTISKAKGQPR <u>R</u> PQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQ <u>E</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 75	константная область HC IgG1m(f)- E345V- K439E- G236R человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G236R- E345V- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELL <u>R</u> GPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR <u>V</u> PQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQ <u>E</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 76	константная область HC IgG1m(f)- E345V- S440K- G237A человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G237A- E345V- S440K человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLG <u>A</u> PSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR <u>V</u> PQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQ <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 77	константная область HC IgG1m(f)- E345Y- K439E- G236R человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G236R- E345Y- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELL <u>R</u> GPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR <u>V</u> PQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQ <u>E</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 78	константная область HC IgG1m(f)- E345Y- S440K- G237A человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G237A- E345Y-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLG <u>A</u> PSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR <u>V</u> PQVYTLPPSR

		S440K человека	EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFN SCSVMHEALHNHYTQK <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 79	константная область HC IgG1m(f) человека	констант- ная область HC IgG1m(f) человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFN SCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQKLSLSPGK
SEQ ID NO 80	константная область HC IgG1m(f)- E430G- K439E человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- E430G- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFN SCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQ <u>E</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 81	константная область HC IgG1m(f)- E430G- K439E- E269K человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- E269K- E430G- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSH <u>K</u> DPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFN SCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQ <u>E</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 82	константная область HC IgG1m(f)- E430G- K439E- E333S человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- E333S- E430G- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPI <u>S</u> KTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFN SCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQ <u>E</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 83	константная область HC IgG1m(f)- E430G- K439E- G236K человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G236K- E430G- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELL <u>K</u> GPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFN

			SCSVMHGALHNHYTQESLSLSPGK
SEQ ID NO 84	константная область HC IgG1m(f)- E430G- K439E- G236R человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G236R- E430G- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLRGPVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHGALHNHYTQESLSLSPGK
SEQ ID NO 85	константная область HC IgG1m(f)- E430G- K439E- G237A человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G237A- E430G- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGAPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHGALHNHYTQESLSLSPGK
SEQ ID NO 86	константная область HC IgG1m(f)- E430G- K439E- G237A- K322A человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G237A- K322A- E430G- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGAPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHGALHNHYTQESLSLSPGK
SEQ ID NO 87	константная область HC IgG1m(f)- E430G- K439E- G237Q человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G237Q- E430G- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGQPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHGALHNHYTQESLSLSPGK
SEQ ID NO 88	константная область HC IgG1m(f)- E430G- K439E- G237R человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G237R- E430G- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGRPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHGALHNHYTQESLSLSPGK
SEQ ID	константная	констант-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE

NO 89	область HC IgG1m(f)- E430G- K439E- G237T человека	ная область HC IgG1m(f)- G237T- E430G- K439E человека	PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSC DKTHTCPPCPAPELLGTPSVFLFPPKPKDTLMISR PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHGALHNHYTQESLSLSPGK
SEQ ID NO 90	константная область HC IgG1m(f)- E430G- K439E- K322A человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- K322A- E430G- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHGALHNHYTQESLSLSPGK
SEQ ID NO 91	константная область HC IgG1m(f)- E430G- K439E- K322E человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- K322E- E430G- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CEVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHGALHNHYTQESLSLSPGK
[]SEQ ID NO 92	константная область HC IgG1m(f)- E430G- K439E- L234A человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- L234A- E430G- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSC DKTHTCPPCPAPEALGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHGALHNHYTQESLSLSPGK
SEQ ID NO 93	константная область HC IgG1m(f)- E430G- K439E- L234A- L235A человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- L234A- L235A- E430G- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHGALHNHYTQESLSLSPGK
SEQ ID NO 94	константная область HC IgG1m(f)-	констант- ная область	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSC

	E430G-K439E-L234F человека	HC IgG1m(f)-L234F-E430G-K439E человека	DKTHTCPPCPAPE <u>F</u> LGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQ <u>E</u> SLSLSPGK
SEQ ID NO 95	константная область HC IgG1m(f)-E430G-K439E-L234F-L235E человека	константная область HC IgG1m(f)-L234F-L235E-E430G-K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPE <u>F</u> EGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQ <u>E</u> SLSLSPGK
SEQ ID NO 96	константная область HC IgG1m(f)-E430G-K439E-L235A человека	константная область HC IgG1m(f)-L235A-E430G-K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPEL <u>A</u> GGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQ <u>E</u> SLSLSPGK
SEQ ID NO 97	константная область HC IgG1m(f)-E430G-K439E-L235E человека	константная область HC IgG1m(f)-L235E-E430G-K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPEL <u>E</u> GGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQ <u>E</u> SLSLSPGK
SEQ ID NO 98	константная область HC IgG1m(f)-E430G-K439E-L235Q человека	константная область HC IgG1m(f)-L235Q-E430G-K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPEL <u>Q</u> GGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQ <u>E</u> SLSLSPGK
SEQ ID NO 99	константная область HC IgG1m(f)-E430G-K439E-	константная область HC IgG1m(f)-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPEL <u>L</u> GGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

	N297Q человека	N297Q- E430G- K439E человека	KTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHGALHNHYTQESLSLSPGK
SEQ ID NO 100	константная область HC IgG1m(f)- E430G- K439E- P329R человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- P329R- E430G- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALRAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHGALHNHYTQESLSLSPGK
SEQ ID NO 101	константная область HC IgG1m(f)- E430G- S440K человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- E430G- S440K человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHGALHNHYTQK K LSLSPGK
SEQ ID NO 102	константная область HC IgG1m(f)- E430G- S440K- E333A человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- E333A- E430G- S440K человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIAKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHGALHNHYTQK K LSLSPGK
SEQ ID NO 103	константная область HC IgG1m(f)- E430G- S440K- E333S человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- E333S- E430G- S440K человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPISKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHGALHNHYTQK K LSLSPGK
SEQ ID NO 104	константная область HC IgG1m(f)- E430G- S440K- G236R человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G236R- E430G-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLRGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR

		S440K человека	EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVF SCSVMHGALHNHYTQK <u>KLSL</u> SPGK
SEQ ID NO 105	константная область HC IgG1m(f)- E430G- S440K- G237A человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G237A- E430G- S440K человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLG <u>A</u> PSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVF SCSVMHGALHNHYTQK <u>KLSL</u> SPGK
SEQ ID NO 106	константная область HC IgG1m(f)- E430G- S440K- G237A- E333S человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G237A- E333S- E430G- S440K человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLG <u>A</u> PSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPI <u>S</u> KTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVF SCSVMHGALHNHYTQK <u>KLSL</u> SPGK
SEQ ID NO 107	константная область HC IgG1m(f)- E430G- S440K- G237Q человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G237Q- E430G- S440K человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLG <u>Q</u> PSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVF SCSVMHGALHNHYTQK <u>KLSL</u> SPGK
SEQ ID NO 108	константная область HC IgG1m(f)- E430G- S440K- G237R человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G237R- E430G- S440K человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLG <u>R</u> PSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVF SCSVMHGALHNHYTQK <u>KLSL</u> SPGK
SEQ ID NO 109	константная область HC IgG1m(f)- E430G- S440K- K322E человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- K322E- E430G- S440K человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLG <u>G</u> PSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK C <u>E</u> VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVF

			SCSVMHGALHNHYTQK <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 110	константная область HC IgG1m(f)- E430G- S440K- K326A человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- K326A- E430G- S440K человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSN <u>A</u> ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHGALHNHYTQK <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 111	константная область HC IgG1m(f)- E430G- S440K- K326A- E333A человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- K326A- E333A- E430G- S440K человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSN <u>A</u> ALPAPI <u>A</u> KTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHGALHNHYTQK <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 112	константная область HC IgG1m(f)- E430G- S440K- K326W человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- K326W- E430G- S440K человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSN <u>W</u> ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHGALHNHYTQK <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 113	константная область HC IgG1m(f)- E430G- S440K- человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- N297Q- E430G- S440K человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHGALHNHYTQK <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 114	константная область HC IgG1m(f)- E430G- S440K- P329R человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- P329R- E430G- S440K человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKAL <u>R</u> APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHGALHNHYTQK <u>K</u> LSLSPGK

SEQ ID NO 115	константная область HC IgG1m(f)- E430N- K439E- G236R человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G236R- E430N- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELL <u>R</u> GPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMH <u>N</u> ALHNHYTQ <u>E</u> SLSLSPGK
SEQ ID NO 116	константная область HC IgG1m(f)- E430N- S440K- G237A человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G237A- E430N- S440K человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELL <u>G</u> APSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMH <u>N</u> ALHNHYTQ <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 117	константная область HC IgG1m(f)- E430T- K439E- G236R человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G236R- E430T- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELL <u>R</u> GPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMH <u>T</u> ALHNHYTQ <u>E</u> SLSLSPGK
SEQ ID NO 118	константная область HC IgG1m(f)- E430T- S440K- G237A человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G237A- E430T- S440K человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELL <u>G</u> APSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMH <u>T</u> ALHNHYTQ <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 119	константная область HC IgG1m(f)- E430V- K439E- G236R человека	константн ая область HC IgG1m(f)- G236R- E430V- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELL <u>R</u> GPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMH <u>V</u> ALHNHYTQ <u>E</u> SLSLSPGK
SEQ ID NO 120	константная область HC	констант- ная	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV

	IgG1m(f)- E430V- S440K- G237A человека	область HC IgG1m(f)- G237A- E430V- S440K человека	TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLG <u>A</u> PSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMH <u>V</u> ALHNHYTQK <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 121	константная область HC IgG1m(f)- E430Y- K439E- G236R человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G236R- E430Y- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELL <u>R</u> GPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMH <u>Y</u> ALHNHYTQ <u>E</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 122	константная область HC IgG1m(f)- E430Y- S440K- G237A человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G237A- E430Y- S440K человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLG <u>A</u> PSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMH <u>Y</u> ALHNHYTQK <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 123	константная область HC IgG1m(f)- G236R- E430G человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G236R- E430G человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELL <u>R</u> GPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQK <u>S</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 124	константная область HC IgG1m(f)- G237A- E430G человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G237A- E430G человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLG <u>A</u> PSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQK <u>S</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 125	константная область HC IgG1m(f)- G237Q-	констант- ная область HC	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLG <u>Q</u> PSVFLFPPKPKDTLMISR

	E430G человека	IgG1m(f)- G237Q- E430G человека	TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHGALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 126	константная область HC IgG1m(f)- G237R- E430G человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G237R- E430G человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGRPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHGALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 127	константная область HC IgG1m(f)- G237T- E430G человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G237T- E430G человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGTPSVFLFPPKPKDTLMISR PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHGALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 128	константная область HC IgG1m(f)- K248E- T437R- K439E- G236R человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G236R- K248E- T437R- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLRGPVFLFPPKPEDTLMISR PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYRQESLSLSPGK
SEQ ID NO 129	константная область HC IgG1m(f)- K248E- T437R- K439E- G237Q человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G237Q- K248E- T437R- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGQPSVFLFPPKPEDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYRQESLSLSPGK
SEQ ID NO 130	константная область HC IgG1m(f)- K248E- T437R- S440K-	констант- ная область HC IgG1m(f)- K248E-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPEDTLMISR PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK

	E333S человека	E333S- T437R- S440K человека	KVSNKALPAPIS <u>SK</u> TISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHY <u>RQK</u> <u>KL</u> SLSPGK
SEQ ID NO 131	константная область HC IgG1m(f)- K248E- T437R- S440K- G237A человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- G237A- K248E- T437R- S440K человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSC DKTHTCPPCPAPELLG <u>APS</u> VFLFPPK <u>PE</u> DTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEK <u>TISK</u> AKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHY <u>RQK</u> <u>KL</u> SLSPGK
SEQ ID NO 132	константная область HC IgG1m(f)- K322E- E430G человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- K322E- E430G человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK <u>CE</u> VSNKALPAPIEK <u>TISK</u> AKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 133	константная область HC IgG1m(f)- P329R- E430G человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- P329R- E430G человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKAL <u>R</u> APIEK <u>TISK</u> AKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 134	константная область HC IgG2-E430G человека	констант- ная область HC IgG2- E430G человека	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCC VECPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEK <u>TISK</u> TKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV M <u>H</u> GALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 135	константная область HC IgG2-E430G- K439E человека	констант- ная область HC IgG2- E430G- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCC VECPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEK <u>TISK</u> TKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT

			PPMLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHGALHNHYTQ <u>ES</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 136	константная область HC IgG2-E430G- K439E- G236R человека	констант- ная область HC IgG2- G236R- E430G- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCC VECPPCPAPPV <u>AR</u> PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHGALHNHYTQ <u>ES</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 137	константная область HC IgG2-E430G- S440K человека	констант- ная область HC IgG2- E430G- S440K человека	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCC VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHGALHNHYTQ <u>KK</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 138	константная область HC IgG2-E430G- S440K- E333S человека	констант- ная область HC IgG2- E333S- E430G- S440K человека	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCC VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPI <u>S</u> KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHGALHNHYTQ <u>KK</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 139	константная область HC IgG3-E430G человека	констант- ная область HC IgG3- E430G человека	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTP LGDTHHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPP PCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFFLYSKLTVD KSRWQQGNIFSCSVMHGALHN <u>R</u> FTQKLSLSPGK
SEQ ID NO 140	константная область HC IgG3-E430G- K439E человека	констант- ная область HC IgG3- E430G- K439E человека	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTP LGDTHHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPP PCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV

			EWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMH <u>G</u> ALHNRFTQ <u>E</u> SLSLSPGK
SEQ ID NO 141	константная область HC IgG3-E430G-K439E- G236R человека	константная область HC IgG3-G236R-E430G-K439E человека	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTP LGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELL <u>R</u> GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMH <u>G</u> ALHNRFTQ <u>E</u> SLSLSPGK
SEQ ID NO 142	константная область HC IgG3-E430G-S440K человека	константная область HC IgG3-E430G-S440K человека	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTP LGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMH <u>G</u> ALHNRFTQK <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 143	константная область HC IgG3-E430G-S440K-E333S человека	константная область HC IgG3-E333S-E430G-S440K человека	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTP LGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI <u>S</u> KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMH <u>G</u> ALHNRFTQK <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 144	константная область HC IgG4-E430G-S228P человека	константная область HC IgG4-S228P-E430G человека	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC <u>P</u> PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQKSLSLSLGK
SEQ ID NO 145	константная область HC IgG4-E430G-K439E-S228P	константная область HC IgG4-S228P-	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC <u>P</u> PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP

	человека	E430G-K439E человека	REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHGALHNHYTQESLSLSLGK
SEQ ID NO 146	константная область HC IgG4-E430G-K439E-S228P-G236R человека	константная область HC IgG4-S228P-G236R-E430G-K439E человека	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTGTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCP <u>P</u> CPAPEFLR <u>G</u> GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHGALHNHYTQESLSLSLGK
SEQ ID NO 147	константная область HC IgG4-E430G-S440K-S228P человека	константная область HC IgG4-S228P-E430G-S440K человека	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTGTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCP <u>P</u> CPAPEFLGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHGALHNHYTQK <u>K</u> LSLSLGK
SEQ ID NO 148	константная область HC IgG4-E430G-S440K-S228P-E333S человека	константная область HC IgG4-E430G-S440K-S228P-E333S человека	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTGTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCP <u>P</u> CPAPEFLGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIS <u>K</u> TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHGALHNHYTQK <u>K</u> LSLSLGK
SEQ ID NO 149	FCGR1AEC DHis		MWFLTLLLVWVVDGQVDTTKAVITLQPPWVSVFQEETVTLHCEVLHLPSSSTQWFLNGTATQTSTPSYRITSASVNDSGEYRCQRGLSGRSDPIQLEIHRGWLLLQVSSRVFTEGEPLALRCHAWKDKLVYNVLYYRNGKAFKFFHWSNLTKTNISHNGTYHCSGMGKHRYTSAGISVTVKELFPAPVLNASVTSPLLEGNLVTLSCEKLLLQRPGLQLYFSFYMGSKTLRG RNTSSEYQILTARREDSGLYWCEAATEDGNVVKRSPELELQVLGLQLPTPVWFHHHHHHH
SEQ ID NO 150	diFCGR2AH -HisBAP		METQMSQNVCPRLWLLQPLTVLLLASADSQA AAPPKAVLKLEPPWINVLQEDSVTLTCQGARSPE SDSIQWFHNGNLIPHTHTQPSYRFKANNNDSGEYTCQTGQTSLSDPVHLTVLSEWLVLQTPHLEFQEGE TIMLRCHSWKDKPLVKVTFQNGKSQKFSHLDPT FSIPQANSHSGDYHCTGNIGYTLFSSKPVTITVQ VPSMGSSSPVAPPKAVLKLEPPWINVLQEDSVTLTCQGARSPESDSIQWFHNGNLIPHTHTQPSYRFKAN

			NNDSGEYTCQTGQTSLSDPVHLTVLSEWLVLQTP HLEFQEGETIMLRCHSWKDKPLVKVTFQNGKSQ KFSHLDPTFSIPQANSHSHSGDYHCTGNIGYTLFSS KPVITITVQVPSMGPGSSSHHHHHHPGGGLNDIFE AQKIEWHE
SEQ ID NO 151	diFCGR2AR -HisBAP		MVLSLLYLLTALPGILSAAPPKAVLKLEPPWINVL QEDSVTLTCQGARSPESDSIQWFHNGNLIPTHTQP SYRFKANNDSGEYTCQTGQTSLSDPVHLTVLSE WLVLQTPHLEFQEGETIMLRCHSWKDKPLVKVT FFQNGKSQKFSRLDPTFSIPQANSHSHSGDYHCTG NIGYTLFSSKPVITITVQVPSMGSSSPAAPPKAVLK LEPPWINVLQEDSVTLTCQGARSPESDSIQWFHN GNLIPTHTQPSYRFKANNDSGEYTCQTGQTSLS DPVHLTVLSEWLVLQTPHLEFQEGETIMLRCHSW KDKPLVKVTFQNGKSQKFSRLDPTFSIPQANSHS SGDYHCTGNIGYTLFSSKPVITITVQVPSMGSSSPG SSSHHHHHHPGGGLNDIFEAQKIEWHE
SEQ ID NO 152	diFCGR2B- HisBAP		MVLSLLYLLTALPGILSAAPPKAVLKLEPQWINVL QEDSVTLTCRGTHSPESDSIQWFHNGNLIPTHTQP SYRFKANNDSGEYTCQTGQTSLSDPVHLTVLSE WLVLQTPHLEFQEGETIVLRCHSWKDKPLVKVTF FQNGKSKKFSRSDPNFSIPQANSHSHSGDYHCTGNI GYTLYSSKPVITITVQAPSSSPMGPAAAPPKAVLKE PQWINVLQEDSVTLTCRGTHSPESDSIQWFHNGN LIPTHTQPSYRFKANNDSGEYTCQTGQTSLSDPV HLTVLSEWLVLQTPHLEFQEGETIVLRCHSWKDK PLVKVTFQNGKSKKFSRSDPNFSIPQANSHSHSGD YHCTGNIGYTLYSSKPVITITVQAPSSSPMGPSSS HHHHHHHPGGGLNDIFEAQKIEWHE
SEQ ID NO 153	diFCGR3AF- HisBAP		MVLSLLYLLTALPGISTEDLPKAVVFLEPQWYRV LEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQA SSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHI GWLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR GLFGSKNVSSETVNITITQGPSMGSSSPSEDLPKA VVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQ WFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLS TLSDPVQLEVHIGWLLQAPRWVFKEEDPIHLRC HSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPK ATLKDSGSYFCRGLFGSKNVSSETVNITITQGPSM GSSSPGPGSSSHHHHHHPGGGLNDIFEAQKIEWH E
SEQ ID NO 154	diFCGR3AV -HisBAP		MVLSLLYLLTALPGISTEDLPKAVVFLEPQWYRV LEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQA SSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHI GWLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR GLVGSKNVSSETVNITITQGPSMGSSSPSEDLPKA VVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQ WFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLS TLSDPVQLEVHIGWLLQAPRWVFKEEDPIHLRC HSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPK

			ATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGPSM GSSSPGPGSSSHHHHHHPGGGLNDIFEAQKIEWH E
SEQ ID NO 155	FcRnECDHis		AESHLSELLYHLTAVSSPAPGTPAFWVSGWLGPQQ YLSYNSLRGAEPCGAWVWENQVSWYWEKETT DLRIKEKLFLEAFKALGGKGPYTLQGLLGCCELGP DNTSVPTAKFALNGEEFMNFDLKQGTWGGDWPE ALAIQRWQQDKAANKELTFLFSCPHRLREHL ERGRGNLEWKEPPSMRLKARSSPGFSVLTCSAF SFYPPELQLRFLRNLAAAGTGQGDGFPNSDGSFH ASSSLTVKSGDEHHYCCIVQHAGLAQPLRVELES PAKSSHHHHHH
SEQ ID NO 156	Бета2- микроглобул ин В2М		IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDI EVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYTE FTPTEKDEYACRVNHVTL SQPKIVKWRDM
SEQ ID NO 157	константная область HC IgG1m(f)- E430G- S440K- K326W- E333S человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- K326W- E333S- E430G- S440K человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNWALPAPIISKISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHGAALHNHYTQK K LSLSPGK
SEQ ID NO 158	константная область HC IgG1m(f)- E345R- E430G- S440Y человека	констант- ная область HC IgG1m(f)- E345R- E430G- S440Y человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR R PQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHGAALHNHYTQK Y LSLSPGK
SEQ ID NO 159	Her2ECDHis (TX1014- Her2ECDHis)		MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMKL RLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPT NASLSFLQDIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRI VRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASP GGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILW KDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSR CWGESSEDCQSLTRTV CAGGCARCKGPLPTDCC HEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCPA LVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYL STDVGSCTLVCPLHNQEVTAEADGTQRCEKCSKPC ARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFG SLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITG YL YISAWPDSLPLDLSVFQNLQVIRGRILHNGAYSL TLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNTHLCFVH TVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLAC HQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQECVEEC RVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFG

			PEADQCVACAHYKDPPFCVARCPSGVKPDLSYM PIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAE QRHHHHHH
SEQ ID NO 160	VH h2E8 (CD52)		EVHLLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSRYG</u> MSWVRQAPGKGLELVAM <u>MKTKGGRT</u> YYPDSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAIYYCAS <u>DGYWGWGQTTVTVSS</u>
SEQ ID NO 161	VH h2E8 CDR1		GFTFSRYG
SEQ ID NO 162	VH h2E8 CDR2		MKTKGGRT
SEQ ID NO 163	VH h2E8 CDR3		ASDGYW
SEQ ID NO 164	VL h2E8		DVVMTQTPLSLSVTLGQPASISCKSS <u>QSLHSDG</u> <u>KTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS</u> KLDSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEADVGIYYC <u>WQGTHLWT</u> FGGGTKVEIK
SEQ ID NO 165	VL h2E8 CDR1		QSLHSDGKTY
	VL h2E8 CDR2		LVS
SEQ ID NO 166	VL h2E8 CDR3		WQGTHLWT
SEQ ID NO 167	VH HLA- DR-hul243		QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKAS <u>GFTFTNYG</u> MNWVKQAPGQGLKWMGW <u>INTYTREPTY</u> ADDF KGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCAR <u>DITAVVPTGFDYWGQGS</u> LVTVSS
SEQ ID NO 168	VH HLA- DR-hul243 CDR1		GFTFTNYG
SEQ ID NO 169	VH HLA- DR-hul243 CDR2		INTYTREP
SEQ ID NO 170	VH HLA- DR-hul243 CDR3		ARDITAVVPTGFDY
SEQ ID NO 171	VL HLA- DR-hul243		DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASE <u>ENIYSN</u> LAW YRQKPGKAPKLLVFA <u>AASN</u> LADGVPSRFSGSGSGT DYTFTISSLQPEDIATYYC <u>QHFWTTPWA</u> FGGGTK LQIK
SEQ ID NO 172	VL HLA- DR-hul243 CDR1		ENIYSN
	VL HLA- DR-hul243 CDR2		AAC
SEQ ID NO 173	VL HLA- DR-hul243 CDR3		QHFWTTPWA
SEQ ID NO 174	VH HLA- DR-1D09C3		QVQLKESGPALVKPTQTLTLTCTFS <u>GFSLS</u> TS <u>SGV</u> <u>G</u> VGWIRQPPGKALEWLAL <u>IDWDDDK</u> YYSTSLKT RLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYC <u>ARS</u>

			<u>PRYRGAFDY</u>WGQGLTVTVSS
SEQ ID NO 175	VH HLA- DR-1D09C3 CDR1		GFSLSTSGVG
SEQ ID NO 176	VH HLA- DR-1D09C3 CDR2		IDWDDDK
SEQ ID NO 177	VH HLA- DR-1D09C3 CDR3		ARSPRYRGAFDY
SEQ ID NO 178	VL HLA- DR-1D09C3		DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSE <u>ESNIGNNNY</u> VQ WYQQLPGTAPKLLIY <u>DNN</u> QRPSGVPDRFSGSKSG TSASLAITGLQSEDEADYYC <u>QSYDMNVHV</u> FGGG TKLTVL
SEQ ID NO 179	VL HLA- DR-1D09C3 CDR1		ESNIGNNNY
	VL HLA- DR-1D09C3 CDR2		DNN
SEQ ID NO 180	VL HLA- DR-1D09C3 CDR3		QSYDMNVHV
SEQ ID NO 181	VH huCLB- T3/4		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSYG</u> MFWVRQAPGKGLEWVAT <u>ISRYSRYI</u> YYPDSVKG RFTISRDNANKSLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARR</u> <u>PLYGSSPDY</u> WGQGLTVTVSS
SEQ ID NO 182	VH huCLB- T3/4 CDR1		GFTFSSYG
SEQ ID NO 183	VH huCLB- T3/4 CDR2		ISRYSRYI
SEQ ID NO 184	VH huCLB- T3/4 CDR3		ARRPLYGSSPDY
SEQ ID NO 185	VL huCLB- T3/4		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASS <u>SSVTY</u> VHWY QQKPGQAPRLLIY <u>DTS</u> KLASGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYC <u>FQGS</u> GYPLTFGSGTKLE MR
SEQ ID NO 186	VL huCLB- T3/4 CDR1		SSVTY
	VL huCLB- T3/4 CDR2		DTS
SEQ ID NO 187	VL huCLB- T3/4 CDR3		FQGSGYPLT
SEQ ID NO 188	VH CD5 INSERM		EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSVT <u>GYSITSGYY</u> WHWIRQFPGNKLEWMGY <u>ISYSGFT</u> NYKTSLINRI SITHDTSENQFFLNLSVTTEDTATYYC <u>CAGDRTG</u> <u>SWFAY</u> WGQGLTVTVSS
SEQ ID NO 189	VH CD5 INSERM CDR1		GYSITSGYY
SEQ ID NO 190	VH CD5 INSERM		ISYSGFT

	CDR2		
SEQ ID NO 191	VH CD5 INSERM CDR3		AGDRTGSWFAY
SEQ ID NO 192	VL CD5 INSERM		DIQVTQSPSSLSASLGERISLTCRTS <u>QDISNY</u> LNWF QQKPDGTFKRLIY <u>ATS</u> SLDSGVPKRFSGSGSGSDY SLTISSLESEDFADYYC <u>LQYASYPFT</u> FGSGTKLEI K
SEQ ID NO 193	VL CD5 INSERM CDR1		QDISNY
	VL CD5 INSERM CDR2		ATS
SEQ ID NO 194	VL CD5 INSERM CDR3		LQYASYPFT
SEQ ID NO 195	VH DR4- chCTB007		EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTAS <u>GFNIKDTY</u> MHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQ GKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYC <u>AYY</u> <u>YVSNAWFTY</u> WGQGLVTVSA
SEQ ID NO 196	VH DR4- chCTB007 CDR1		GFNIKDTY
SEQ ID NO 197	VH DR4- chCTB007 CDR2		IDPANGNT
SEQ ID NO 198	VH DR4- chCTB007 CDR3		AYYYVSNAWFTY
SEQ ID NO 199	VL DR4- chCTB007		DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASE <u>ENIYSN</u> LEW YQQKQKGKSPQLLVYA <u>AAT</u> NLADGVPSRFSGSGSG TQYSLKINSLQSEDFGSYYC <u>QHFWGTWT</u> FGGGT KLEIK
SEQ ID NO 200	VL DR4- chCTB007 CDR1		ENIYSN
	VL DR4- chCTB007 CDR2		AAT
SEQ ID NO 201	VL DR4- chCTB007 CDR3		QHFWGTWT

Таблица, определяющая замены, которые были протестированы в примерах 5-23.

Замена	Цель
G4-S228P	IgG4-специфическая замена, которая стабилизирует шарнирную область G4 (ингибирует восстановление)
K248E	Стимуляция самоолигомеризации
L234A	Ингибирование связывания FcGammaR; умеренное ингибирование связывания C1q

L234F	Ингибирование связывания FcGammaR; слабое ингибирование связывания C1q
L235A	Ингибирование связывания FcGammaR; умеренное ингибирование связывания C1q
L235Q	Ингибирование связывания FcGammaR; умеренное ингибирование связывания C1q
L234A-L235A	Ингибирование связывания FcGammaR; умеренное ингибирование связывания C1q
L234F-L235E	Ингибирование связывания FcGammaR; умеренное ингибирование связывания C1q
G236R	Ингибирование связывания FcGammaR; умеренное ингибирование связывания C1q
G236K	Ингибирование связывания FcGammaR; умеренное ингибирование связывания C1q
G237A	Ингибирование связывания FcGammaR; слабое ингибирование связывания C1q
G237T	Ингибирование связывания FcGammaR; слабое ингибирование связывания C1q
G237Q	Ингибирование связывания FcGammaR; умеренное ингибирование связывания C1q
G237R	Ингибирование связывания FcGammaR; промежуточное ингибирование связывания C1q
K322A	Умеренное ингибирование связывания C1q
K322E	Сильное ингибирование связывания C1q
K326A	Стимуляция связывания C1q
K326W	Стимуляция связывания C1q
K326A-E333A	Стимуляция связывания C1q
K326W-E333S	Стимуляция связывания C1q
A327K	Ингибирование связывания FcGammaR; промежуточное ингибирование связывания C1q
P329R	Ингибирование связывания FcGammaR; сильное ингибирование связывания C1q
E333A	Стимуляция связывания C1q
E333S	Стимуляция связывания C1q
E345K	Стимуляция самоолигомеризации
E345R	Стимуляция самоолигомеризации
E345A	Стимуляция самоолигомеризации
E345Q	Стимуляция самоолигомеризации
E345V	Стимуляция самоолигомеризации
E345Y	Стимуляция самоолигомеризации
E430G	Стимуляция самоолигомеризации
E430N	Стимуляция самоолигомеризации
E430T	Стимуляция самоолигомеризации
E430V	Стимуляция самоолигомеризации
E430Y	Стимуляция самоолигомеризации
T437R	Стимуляция самоолигомеризации
K439E	Подавление самоолигомеризации
S440K	Подавление самоолигомеризации

Таблица, определяющая замены, ингибирующие самоолигомеризацию.

Первый полипептид, содержащий Fc-область	Второй полипептид, содержащий Fc-область
K439E	S440K
S440K	K439E

Таблица, определяющая замены, ингибирующие связывание FcGammaR и ингибирующие связывание с C1q.

Замена	Цель
L234A	Ингибирование связывания FcGammaR; умеренное ингибирование связывания C1q
L234F	Ингибирование связывания FcGammaR; слабое ингибирование связывания C1q
L235A	Ингибирование связывания FcGammaR; умеренное ингибирование связывания C1q
L235Q	Ингибирование связывания FcGammaR; умеренное ингибирование связывания C1q
L234A-L235A	Ингибирование связывания FcGammaR; умеренное ингибирование связывания C1q
L234F-L235E	Ингибирование связывания FcGammaR; умеренное ингибирование связывания C1q
G236R	Ингибирование связывания FcGammaR; умеренное ингибирование связывания C1q
G236K	Ингибирование связывания FcGammaR; умеренное ингибирование связывания C1q
G237A	Ингибирование связывания FcGammaR; слабое ингибирование связывания C1q
G237T	Ингибирование связывания FcGammaR; слабое ингибирование связывания C1q
G237Q	Ингибирование связывания FcGammaR; умеренное ингибирование связывания C1q
G237R	Ингибирование связывания FcGammaR; промежуточное ингибирование связывания C1q
A327K	Ингибирование связывания FcGammaR; промежуточное ингибирование связывания C1q
P329R	Ингибирование связывания FcGammaR; сильное ингибирование связывания C1q

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1

Конструкции для экспрессии антител

Для экспрессии человеческих и гуманизированных антител, используемых в данном документе, последовательности варибельной тяжелой (VH) цепи и варибельной легкой (VL) цепи были получены путем синтеза генов (GeneArt Gene Synthesis; ThermoFisher Scientific) и клонированы в экспрессирующих векторах pcDNA3.3

(ThermoFisher Scientific), содержащих константную область тяжелой цепи (HC) IgG человека (константная область IgG1m(f) человека HC: SEQ ID NO 22; константная область IgG2 человека HC: SEQ ID NO 31; константная область IgG3 человека HC: SEQ ID NO 32; или константная область IgG человека4 HC: SEQ ID NO 33), и/или константную область легкой цепи (LC) каппа человека: SEQ ID NO 34. Искомые мутации были внесены путем генного синтеза. Варианты антитела к CD20 в этой заявке имеют последовательности VH и VL, полученные из ранее описанного антитела к CD20 IgG1-CD20-11B8 (WO2004/035607; VH: SEQ ID NO 8; VL: SEQ ID NO 12). Варианты антитела CD52 в этой заявке имеют последовательности VH и VL, полученные из ранее описанного антитела CAMPATH-1H к CD52 (Crowe et al., 1992 Clin Exp Immunol. 87 (1): 105-110; VH: SEQ ID NO 1; VL: SEQ ID NO 5) и из ранее описанного антитела CD52 h2E8 (US2014/0127236; VH: SEQ ID NO 160; VL: SEQ ID NO 164). Варианты антитела CD37 в этой заявке имеют последовательности VH и VL, полученные из ранее описанного антитела к CD37 IgG1-CD37-37.3 (WO2011/112978; VH: SEQ ID NO 42; VL: SEQ ID NO 46). Варианты антитела DR4 в этой заявке имеют последовательности VH и VL, полученные из ранее описанного антитела DR4 DR4-chCTB007 (US2009/0136503A1; VH: SEQ ID NO 200; VL: SEQ ID NO 204). Варианты антитела DR5 в этой заявке имеют последовательности VH и VL, полученные из ранее описанного антитела DR5 DR5-01-G56T (WO 2017/093447; VH: SEQ ID NO 49; VL: SEQ ID NO 53) и DR5-05 (WO2014/009358; VH: SEQ ID NO 56; VL: SEQ ID NO 60). Варианты антитела HLA-DR в этой заявке имеют последовательности VH и VL, полученные из ранее описанного HLA-DR-антитела HLA-DR-hul243 (US8722047B2; VH: SEQ ID NO 168; VL: SEQ ID NO 172) и из ранее описанного HLA-DR. антитело HLA-DR-1D09C3 (US7521047B2; VH: SEQ ID NO 176; VL: SEQ ID NO 180). Варианты антитела CD3 в этой заявке имеют последовательности VH и VL, полученные из ранее описанного антитела против CD3 huCLB-T3/4 (Parren et al., Res. Immunol 1991 ноябрь-декабрь; 142 (9): 749-63; VH: SEQ ID NO 184; VL: SEQ ID NO 188). Варианты антитела CD5 в этой заявке имеют последовательности VH и VL, полученные из ранее описанного антитела CD5 CD5-INSERM (WO2010145895; VH: SEQ ID NO 192; VL: SEQ ID NO 196). Человеческое антитело IgG1 b12, антитело, специфичное к HIV gp120, использовали в качестве отрицательного контроля в некоторых экспериментах (Barbas et al., J Mol Biol. 1993 Apr 5;230(3):812-23; VH: SEQ ID NO 15; VL: SEQ ID NO 19).

Конструкции антител с транзитной экспрессией

Смеси плазмидной ДНК, кодирующие как тяжелые, так и легкие цепи антител, временно трансфицировали в клетки Expi293F (Gibco, кат. № A14635) с использованием 293fectin (Life Technologies), по существу, как описано Vink et al. (Vink et al., 2014 Methods

65(1):5-10). Концентрации антител в надосадочных жидкостях измеряли по оптической плотности при 280 нм. Надосадочные жидкости, содержащие антитела, либо непосредственно использовали в анализах *in vitro*, либо антитела очищали, как описано ниже.

Очистка антител и оценка качества

Антитела очищали аффинной хроматографией на протеине А. Надосадочные жидкости культур фильтровали через тупиковый фильтр 0,20 мкм и загружали на 5 мл колонки MabSelect SuRe (GE Healthcare), промывали и элюировали 0,02 М цитратом натрия-NaOH, pH 3. Элюаты загружали в колонку HiPrep Desalting (GE Healthcare) сразу после очистки, и антитела заменяли буфером на 12,6 мМ NaH₂PO₄, 140 мМ NaCl, буфер pH 7,4 (B.Braun или Thermo Fisher). После замены буфера образцы стерилизовали фильтрованием через тупиковые фильтры 0,2 мкм. Очищенные белки анализировали с помощью ряда биоаналитических анализов, включая капиллярный электрофорез на гелях додецилсульфат-полиакриламид натрия (CE-SDS) и высокоэффективную эксклюзионную хроматографию (HP-SEC). Концентрацию измеряли по поглощению при 280 нм. Очищенные антитела хранили при 2-8°C.

Пример 2: Селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов путем введения мутации P329R в анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-K439E + анти-CD20 IgG1-11B8-S440K с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc E430G

Влияние мутации P329R на эффективность CDC *in vitro* тестировали с использованием смесей вариантов анти-CD20 антитела IgG1-11B8 и анти-CD52 антитела IgG1-CAMPATH-1H. Различные концентрации очищенных антител (диапазон конечных концентраций 0,001-60,0 мкг/мл) были протестированы в анализе CDC *in vitro* на клетках Wien 133 с 20% NHS. В антитела IgG1-11B8 и IgG1-CAMPATH-1H: E430G были введены различные мутации, которые индуцируют усиленные взаимодействия Fc-Fc; P329R, который ингибирует прямое связывание с C1q с антителами; и любая из мутаций K439E или S440K, которые ингибируют образование гомогексамерных комплексов антител посредством ингибирования межмолекулярных взаимодействий Fc-Fc и способствуют образованию комплексов гетерогексамерных антител посредством кросс-комплементарных взаимодействий Fc-Fc. В качестве контролей отдельные антитела также смешивали в соотношении 1: 1 с изотипными контрольными антителами IgG1-b12 или IgG1-b12-E430G, чтобы обеспечить прямое сравнение концентраций индивидуальных компонентов и смесей, состоящих из них. Для анализа CDC 0,1 x 10⁶ клеток Wien 133 (любезно предоставленных доктором Джеффом Хейлом, BioAnaLab Limited, Оксфорд,

Великобритания) в RPMI (Lonza, кат. BE12-115F) с 0,2% бычьим сывороточным альбумином (BSA; Roche, кат. № 10735086001) предварительно инкубировали в полистирольных круглодонных 96-луночных планшетах (Greiner bio-one, кат. № 650101) с серией концентраций очищенных антител в общий объем 80 мкл в течение 15 мин на шейкере при комнатной температуре. Затем 20 мкл нормальной человеческой сыворотки (NHS; Sanquin, ссылочный No. M0008) добавляли в качестве источника комплемента и инкубировали в инкубаторе при 37°C в течение 45 минут (конечная концентрация NHS 20%; конечные концентрации антител 0,001-10,0 мкг/мл в 3-кратных разведениях). Реакцию останавливали, помещая планшеты на лед перед осаждением клеток центрифугированием и заменяя надосадочную жидкость 20 мкл 2 мкг/мл раствора йодида пропидия (PI; Sigma Aldrich, кат. P4170). Количество PI-положительных клеток определяли проточной цитометрией на скрининге Intellicyt iQue (Westburg), и процент лизиса рассчитывали как (количество PI-положительных клеток/общее количество клеток) x 100%. Данные анализировали с использованием наиболее подходящих значений нелинейной подгонки дозозависимого эффекта с использованием логарифмически преобразованных концентраций в GraphPad PRISM и рассчитывали площадь под кривыми доза-ответ для трех экспериментальных повторов. Значения относительных площадей под кривой (AUC) представляют собой нормализацию к минимальному лизису (0% с IgG1-b12) и максимальному лизису (100% со смесью IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G).

Смесь 1: 1 анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G (оба содержат SEQ ID NO 26) индуцировала эффективный лизис клеток клеток Wiens 133 (Фигура 1 показывает селективность активности CDC посредством смешанные антительные варианты анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K путем введения мутации P329R. Клетки Wien 133 инкубировали с серией концентраций антител и концентраций в присутствии 20% объединенной нормальной сыворотки человека (NHS). Эффективность CDC представлена как (A) процент лизиса, определяемый процентным содержанием пропидий-йодид (PI)-положительных клеток, и (B) площадь под кривыми доза-ответ-реакция (AUC), нормированные на несвязывающее контрольное антитело IgG1-b12 (0%) и смесь IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%). На Фигуре 1 показана селективность активности CDC для смешанных антительных вариантов анти-IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K при введении мутации P329R. Клетки Wien 133 инкубировали с серией концентраций антител и концентраций в присутствии 20% объединенной нормальной сыворотки человека (NHS). Эффективность

CDC представлена как (А) процент лизиса, определяемый процентным содержанием пропидий-йодид (PI)-положительных клеток, и (В) площадь под кривыми доза-ответ-реакция (AUC), нормированные на несвязывающее контрольное антитело IgG1-b12 (0%) и смесь IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 2 показана селективность активности CDC для смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K при введении мутации K322E. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как (А) процент лизиса, определяемый процентом PI-положительных клеток, и (В) AUC, нормализованная к несвязывающемуся контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 3 показана избирательность активности CDC при введении мутации K322E в смешанные антительные варианты анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + анти-CD20-11B8-E430G-S440K в различных клеточных линиях. Анализы CDC *in vitro* проводили с 30 мкг/мл антител в присутствии 20% NHS с использованием клеточных линий лимфомы Беркитта Wien 133 (А), Daudi (В), Raji (С) и Ramos (D), острой лимфобластной лимфомы (ALL) клеточной линии REH (E), клеточной линии миеломы U266B1 (F) и клеточной линии В-клеточной лимфомы U-698-M (G). Активность CDC представлена как процент лизиса, определяемый процентом PI-положительных клеток, нормализованных к клеточной линии к несвязывающим контрольным антителам IgG1-b12 (0%) и IgG1-CAMPATH-1H-E430G (100%) для REH, U266B1, и Wien 133 или IgG1-11B8-E430G (100%) для Daudi, Raji, Ramos и U-698-M.

На Фигуре 4 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q (G236R, K322A, E269K, K322E или P329R) + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для смеси несвязывающихся контрольных антител IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 5 показана селективность активности CDC для смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией, усиливающей связывание с C1q (E333S, K326W или K326A/E333A). Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-

положительных клеток. Нормализацию проводили для смеси несвязывающихся контрольных антител IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 6 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R (A), K322A (B), E269K (C), K322E (D) или P329R (E) + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией, усиливающей связывание с C1q (E333S, K326W или K326A/E333A). Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для смеси несвязывающихся контрольных антител IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 7 показано связывание антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A (A, B), и антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией E333S (C, D), усиливающей связывание с C1q, с линиями клеток лимфомы человека Wien 133 (A, C) и Raji (B, D). Связывание антител тестировали с помощью проточной цитометрии. Связывание выражали как среднее геометрическое значение интенсивности флуоресценции (MFI). В качестве отрицательного контроля для связывания использовали образец без первичного антитела или несвязывающего анти-gp120 антитела IgG1-b12.

На Фигуре 8 показана ADCC-способность антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A, (A, C) и антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией, усиливающей связывание с C1q, E333S (B, D). (A, B) Был проведен репортерный биоанализ ADCC, в котором клетки-мишени Raji совместно инкубировали с серией разведений антител и человеческими Т-клетками Jurkat, стабильно экспрессирующими высокоаффинный FcγRIIIa (V158) и респонсивный элемент NFAT, управляющий экспрессией люциферазы светлячка. Продуцирование люциферазы количественно оценивали по люминесценции. (C, D) Был проведен анализ ADCC *in vitro* Europium TDA (EuTDA), в котором клетки-мишени Wien 133 совместно инкубировали с серией разведений антител и РВМС человека (Е: Т 100:1). Лизис клеток определяли путем измерения сигнала флуоресцентного хелата EuTDA в надосадочной жидкости.

На Фигуре 9 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов, Fc-Fc-взаимодействие усиливало анти-CD52 IgG1-CAMPATH-

1H-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A, + варианты Fc-Fc-взаимодействия усиливали анти-CD20 IgG1-11B8- S440K с или без мутации, усиливающей связывание с C1q, E333S. Тестируемые мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, представляли собой E430G, E345K, E345R и E345R-E430G. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и максимального лизиса. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 10 показана селективность активности CDC при использовании смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутациями, модулирующими связывание с C1q, в положении G236 (G236R или G236K) или положении G237 (G237A, G237T, G237Q или G237R), или двойной мутации G237A-K322A + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с или без мутации, модулирующей связывание с C1q, E333S, E333A, K326A, K326W-E333S, G237A или G237A-E333S. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и максимального лизиса. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 11 показана селективность активности CDC для вариантов изотипа смешанных антител (IgG1, IgG2, IgG3 и стабилизированный шарниром IgG4) анти-CD52 CAMPATH-1H-E430G-K439E с или без мутации ингибирования связывания с C1q G236R + анти-CD20 11B8-E430G-S440K, с или без мутации, усиливающей связывание с C1q, E333S. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 12 показана селективность активности CDC при использовании смешанных антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с или без мутации ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A, + анти-CD37 IgG1-CD37-37.3-E430G-S440K с или без мутации E333S, усиливающей связывание с C1q, на (A) клетках Daudi и (B) клетках Wien 133. Клетки-мишени инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная

AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-CD37-37.3-E430G (100%).

На Фигуре 13 показана DR5-опосредованная цитотоксичность (A) вариантов отдельного антитела или (B) смеси агонистов антительных вариантов анти-DR5 IgG1-DR5-01-G56T-E430G-K439E с или без мутации ингибирования связывания с C1q G236R + IgG1-DR5-05-E430G-S440K с или без мутации E333S, усиливающей связывание с C1q, на клетках рака поджелудочной железы человека ВхРС-3. Проводили трехдневный анализ жизнеспособности, при этом жизнеспособность клеток определяли с использованием набора CellTiter-Glo.

На Фигуре 14 показана активность CDC антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G с мутацией, модулирующей связывание с C1q, G237A, G236R, A327K, K322E или P329R. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12-S440K (0%; не показано) и IgG1-CAMPATH-1H-E430G (100%).

На Фигуре 15 показано связывание антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A (A, B, C), и антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией, усиливающей связывание с C1q, E333S (D, E, F) с FcRn человека. FcRn ELISA выполняли с 5 мкг/мл рекомбинантного внеклеточного домена FcRn человека (FcRnhsECDHis-B2M-BIO), нанесенного в виде покрытия, и серии разведений антител. Количество связанных антител определяли с помощью конъюгированного с HRP козьего антитела против IgG1 человека и хемилюминесцентного субстрата ABTS. Поглощение измеряли при 405 нм.

На Фигуре 16 показана скорость клиренса 500 мкг внутривенно введенного антитела у мышей SCID. (AC) Общий IgG человека в образцах плазмы определяли с помощью ELISA и наносили на график зависимости концентрации от времени для (A) вариантов IgG1-CAMPATH-1H, (B) вариантов IgG1-11B8 и (C) комбинаций вариантов IgG1-CAMPATH-1H + вариантов IgG1-11B8. Каждая точка данных представляет собой среднее +/- стандартное отклонение трех образцов. (D) Клиренс до 21 дня после введения антитела определяли по формуле $D*1000/AUC$ с D, введенной дозой и AUC, площадью под кривой зависимости концентрации от времени.

На Фигуре 17 показано связывание иммобилизованных вариантов IgG1-

CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутациями ингибирования связывания с C1q G236R или G237T и вариантов IgG1-11B8-E430G-S440K с мутациями K326A или E333S, усиливающими связывание с C1q, с димерным His-меченным биотинилированным ECD из FcγRIIA аллотипа 131H (A), FcγRIIA аллотипа 131R (B), FcγRIIB (C), FcγRIIA аллотипа 158V (D) и FcγRIIA аллотипа 158F (E), протестированных в анализах ELISA. Связывание представлено для образцов антител с концентрацией 20 мкг/мл относительно контроля без антител (фон) и связывания с IgG1-11B8-E430G-S440K (100%). Детекцию проводили с использованием Стрептавидин-полиHRP и ABTS.

На Фигуре 18 показана селективность активности CDC при использовании смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с или без мутации, ингибирующей связывание с C1q (G236R или G237T) + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией G237A, ингибирующей связывание с FcγR, с или без мутации E333S, усиливающей связывание с C1q. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и как лизис при 40 мкг/мл IgG. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 19 показана избирательная активность комбинаций вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в цельной крови, определенная анализом клеток крови с помощью проточной цитометрии. Оси Y: фракция В-клеток (CD19-положительные/CD3-отрицательные) или фракция Т-клеток (CD19-отрицательные/CD3-положительные) от общей популяции лимфоцитов (CD66b-отрицательные) после инкубации в присутствии эффекторных клеток. Ось X: разные группы обработки. Символы представляют клетки от пяти разных здоровых доноров, протестированных в двух отдельных инкубациях для каждого донора. (A) Селективная активность IgG1-CAMPATH-1H-G236R-E430G-K439E, смешанного с IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. (B) Селективная активность вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, содержащих дополнительную мутацию G237, в смеси с IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. (C) Селективная активность вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, содержащих дополнительную мутацию G236R или G237, смешанных с IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K, содержащим дополнительную мутацию E333S, усиливающую связывание с C1q. (D) Степень истощения В-клеток различными целевыми антителами для В-клеток по сравнению с взаимозависимыми комбинациями антител IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с дополнительными мутациями G236R, G237Q или G237R, смешанными с IgG1-11B8-G237A -E430G-S440K. Ось Y:

представление в логарифмической шкале фракции В-клеток, определенной, как указано выше.

На Фигуре 20 показана селективность активности CDC на разных линиях клеток с разными уровнями экспрессии CD20 и CD52 за счет комбинации антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E и IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией, ингибирующей связывание с C1q в анти-CD52 компоненте и мутацией, усиливающая связывание с C1q в анти-CD20 компоненте. Анализы CDC *in vitro* проводили с 0,01-40 мкг/мл антитела в присутствии 20% NHS с использованием клеточных линий лимфомы Беркитта Daudi (A), Raji (B) и Ramos (C), линии клеток ALL REH (D) и клеточной линии В-клеточной лимфомы U-698-M (E). Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и как максимальный лизис. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 21 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов анти-CD37 IgG1-CD37-37.3-E430G-K439E с или без мутации G236R, ингибирующей связывание с C1q, + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с или без мутации E333S, усиливающей связывание с C1q. (A) Клетки Daudi и (B) клетки WIL2-S инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и как лизис при 40 мкг/мл IgG. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CD37-37.3-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 22 показано (A) связывание антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H с мутациями E430G или E345R, усиливающими взаимодействие Fc:Fc, мутацией K439E, ингибирующей самоолигомеризацию, в комбинации с любой из мутаций ингибиторования связывания FcγR и модуляции связывания с C1q, G236R, G237A или G237T, с клеточной линией лимфомы человека Wien 133. Связывание антител тестировали с помощью проточной цитометрии и представляли нормализованными относительно значения Vmax IgG1-Campath-1H дикого типа (100%). В качестве отрицательного контроля для связывания использовали несвязывающее анти-gp120 антитело IgG1-b12. (B) Максимальное связывание (Vmax) с клетками Raji антительных вариантов IgG1-Campath-1H с мутациями E430G и K439E, в комбинации с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, G236R, G237A или G237T, показано нормализованным относительно связывания IgG1-Campath-1H дикого типа (C) Кажущиеся значения Kd

антительных вариантов IgG1-Campath-1H с мутациями E430G и S440K в сочетании с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, G236R, G237A или G237T, связывающихся с клетками Raji.

На Фигуре 23 показано связывание антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8 с мутацией E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, мутацией S440K, ингибирующей самоолигомеризацию, в комбинации с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, K326A или E333A (A) или E333S, G237A или G237A-E333S (B) к линии клеток лимфомы человека Raji. Связывание антител тестировали с помощью проточной цитометрии и представляли нормализованными относительно значения V_{max} IgG1-11B8 дикого типа (100%). В качестве отрицательного контроля для связывания использовали несвязывающее анти-gp120 антитело IgG1-b12. (C, D) Максимальное связывание (V_{max}) с клетками Raji антительными вариантами IgG1-11B8 с мутациями E430G и S440K, в сочетании с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, K326A или E333A (C) или E333S, G237A или G237A-E333S (D) показан нормализованным относительно связывания IgG1-11B8 дикого типа (E, F). Кажущиеся значения K_d антительных вариантов IgG1-11B8 с мутациями E430G и S440K в сочетании с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, K326A или E333A (E) или связывание E333S, G237A или G237A-E333S (F) с клетками Raji.

На Фигуре 24 показано связывание FcRn антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и анти-CD20 IgG1-11B8. (A, C) Связывание с FcRn человека показано для вариантов анти-CD52 антитела IgG1-CAMPATH-1H с мутацией E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, мутацией K439E, ингибирующей самоолигомеризацию, и мутациями, модулирующими связывание с C1q, G237A или G237T, с использованием концентрации антител 40 мкг/мл при (A) pH 6,0 или (C) pH 7,4. (B, D) Связывание с FcRn человека вариантами анти-CD20-антитела IgG1-11B8 с мутацией E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, мутацией S440K, ингибирующей самоолигомеризацию, и мутациями, модулирующими связывание с C1q, K326A, E333A, G237A или G237A-E333S, с использованием концентрации антител 40 мкг/мл при (B) pH 6,0 или (D) pH 7,4. FcRn ELISA выполняли с 2 мкг/мл покрытого рекомбинантным внеклеточным доменом FcRn человека (FcRnECDHis-B2M-BIO) и серии разведений антител. Количество связанных антител определяли с помощью конъюгированного с HRP козьего антитела против IgG1 человека и хемилюминесцентного субстрата ABTS. Поглощение измеряли при 405 нм.

На Фигуре 25 показаны концентрации общего IgG человека (hIgG), измеренные в образцах крови, взятых у мышей, которым инъецировали антительные варианты анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H или анти-IgG1-11B8 или их смеси. (A) Общая концентрация

hIgG в образцах крови, собранных у мышей, которым инъецировали IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q или IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R дикого типа. (B) Общая концентрация hIgG в образцах крови, собранных у мышей, которым вводили IgG1-11B8 дикого типа, IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A или IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S. (C) Общая концентрация hIgG в образцах крови, собранных у мышей, которым инъецировали смеси IgG1-CAMPATH-1H дикого типа + IgG1-11B8 или смеси антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8, несущих мутации, как в (A) и (B). На всех фигурах пунктирная линия представляет прогнозируемую концентрацию IgG1 во времени для антител IgG1 дикого типа у мышей SCID. (D) Клиренс до 21 дня после введения антитела определяли по формуле $D*1000/AUC$ с D, введенной дозой и AUC, площадью под кривой зависимости концентрации от времени.

На Фигуре 26 показана концентрация C4d (в мкг/мл), обнаруженная в образцах, инкубированных с антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-11B8 и IgG1-b12, несущими мутации E430G, K439E или S440K и G236R, G237A, G237Q или G237R, после вычитания средней концентрации C4d, обнаруженной в образцах отрицательного контроля, не содержащих антител. Положительные контрольные образцы включают антительные варианты, несущие мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc E345R, E430G и S440Y (RGY).

На Фигуре 27 показано связывание с C1q с клетками Wien 133, инкубируемыми на льду с нормальной сывороткой человека в качестве источника комплемента, после опсонизации антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-11B8 и IgG1-b12, несущих мутации E430G, K439E или S440K и G236R, G237T, K326A или E333S, детектируемое с помощью проточной цитометрии. Средние значения интенсивности флуоресценции были нормализованы к контрольным реакциям без антител (0%) и верхнему уровню смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%), оцененного путем подбора логарифмической модели ответа агониста. (A) Связывание C1q контрольных реакций. (B-D) Связывание C1q (B) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E, (C) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E-G236R и (D) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E-G237R, смешанных с несвязывающим контролем IgG1-b12 или различными вариантами IgG1-11B8.

На Фигуре 28 показано связывание Fc γ R антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H-E430G и IgG1-11B8-E430G, несущих мутацию K439E или S440K, ингибирующую самоолигомеризацию, и мутации, модулирующие связывание с C1q. (A-E) Связывание вариантов иммобилизованных антител с димерными His-меченными биотинилированными ECD, как было протестировано в анализах ELISA, (A)

высокоаффинного аллотипа FcγRIIA 131H, (B) низкоаффинного аллотипа FcγRIIA 131R, (C) FcγRIIB, (D) высокоаффинного аллотипа FcγRIIA 158V или (E) низкоаффинного аллотипа FcγRIIA 158F. (F) Связывание иммобилизованного FcγRIa с вариантами антител, протестированными в ELISA. Связывание представлено для образцов антител с концентрацией 20 мкг/мл и было нормализовано для каждого эксперимента после вычитания сигналов в лунках, инкубированных без первичного антитела, относительно усредненного сигнала, наблюдаемого для IgG1-CAMPATH-1H дикого типа (100%). Детекцию проводили с использованием Стрептавидин-полиHRP и ABTS.

На Фигуре 29 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H, анти-CD20 IgG1-11B8 и анти-CD52 IgG1-h2E8 путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулировать связывание с C1q. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC измерялась в трех независимых экспериментах и представлена как (A) усредненная AUC, нормализованная к несвязывающему контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%) и (B) средний процент лизиса, определенный по положительности в анализе с пропидиум йодидом при концентрации антитела 40 мкг/мл.

На Фигуре 30 (A, B) показана эффективность CDC отдельного агента и комбинированных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G, анти-CD20 IgG1-11B8-E430G и неантигенсвязывающих антител IgG1-b12-E430G, несущих собственные мутации, ингибирующие олигомеризацию, и мутации, модулирующие связывание с C1q, как указано. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как AUC, нормализованная к несвязывающему контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 31 показана активация линий репортерных клеток Jurkat, стабильно экспрессирующих либо (A) FcγRIIa, либо (B) FcγRIIIa, при измерении по уровню люминесценции (RLU) при совместном культивировании с клетками лимфомы Raji и различными концентрациями антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8. Значения люминесценции были нормализованы для каждого эксперимента относительно тех, которые наблюдались для IgG1-b12 (0%) и IgG1-Campath-1H дикого типа + IgG1-11B8 дикого типа (100%), перед усреднением по трем (FcγRIIa) или двум (FcγRIIIa) экспериментальным повторам.

На Фигуре 32 показана взаимозависимая CDC на клетках Wien 133, индуцированный смесями антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8, несущих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q в неэквиволярных

соотношениях. (А) Козависимая CDC, индуцированная смесями, содержащими эквимоллярные и неэквимоллярные отношения концентраций IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R и IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A. (В) Козависимая CDC, индуцированная смесями, содержащими эквимоллярные и неэквимоллярные отношения концентраций IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q и IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A.

На Фигуре 33 показана селективность активности CDC с помощью смесей антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H с вариантами анти-HLA-DR IgG1-HLA-DR-huL243 (А) или вариантами анти-HLA-DR IgG1-HLA-DR-1D09C3 (В) путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и ингибируют связывание с C1q. Клетки Oci-Ly17 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как AUC, нормализованная к несвязывающемуся контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси (А) IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-HLA-DR-huL243-E430G (100%) или (В) IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-HLA-DR-1D09C3-E430G (100%).

На Фигуре 34 показана селективная взаимозависимая активность CDC смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и анти-CD20 IgG1-11B8 путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и ингибируют связывание с C1q. Эффективность CDC показана для вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с любой из мутаций L234A, L234A-L235A, L234F, L234F-L235E, L235A, L235Q, G236R или G237Q и смесей этих вариантов с несвязывающим контрольным антителом IgG1-b12 или IgG1-11B8-E430G-S440K. Эффективность CDC представлена как AUC, нормализованная к несвязывающему контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 35 показана селективная взаимозависимая активность CDC смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и анти-CD20 IgG1-11B8 путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и ингибируют связывание с C1q. (А) Эффективность CDC антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в виде отдельных агентов или их смесей, несущих мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345K, E345Q, E345R или E345Y, мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, и мутации, ингибирующие связывание с C1q, G236R или G237A. (В) Эффективность CDC антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в виде отдельных агентов или их смесей, несущих мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345Q, E345V или E345Y, мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, и мутации, ингибирующие связывание с C1q, G236R или G237A. (С) Эффективность CDC антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в виде отдельных агентов или их смесей, содержащих соответствующие мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc,

E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345Q, E345V или E345Y, мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, и мутации, ингибирующие связывание с C1q, G236R или G237A. (D) Эффективность CDC антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в виде отдельных агентов или их смесей, несущих мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, E430G или K248E-T437R, мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, и мутации, ингибирующие связывание с C1q, G236R, G237A или E333S. Эффективность CDC представлена как AUC, нормализованная к несвязывающему контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 36 показан взаимозависимая CDC на клетках лимфомы Raji, индуцированный смесями антительных вариантов IgG1-CD37-37-3 и IgG1-11B8, несущих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q. (A) Относительные площади под кривой (AUC), нормализованные к минимальному лизису (0% с IgG1-b12) и максимальному лизису (100% со смесью IgG1-CD37-37-3-E430G + IgG1-11B8 -E430G) лизиса клеток, индуцированного указанными антительными вариантами в разведении или их смесями. (B) Максимальный процент лизиса, индуцированного указанными антительными вариантами и их смесями.

На Фигуре 37 показана селективная взаимозависимая активность CDC смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и анти-CD20 IgG1-11B8 путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q. Образцы CLL пациентов инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как процент жизнеспособных В-клеток при инкубации с вариантами антител. Показаны результаты с использованием образцов CLL от пациентов 1 (A), 2 (B) и 3 (C).

На Фигуре 38 показана фракция В-клеток, CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток, обнаруженная с помощью проточной цитометрии после инкубации образцов цельной крови со смесями антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-huCLB-T3/4 и IgG1-CD5-INSERM, несущих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q. Процент (A) В-клеток, (B) CD4⁺ Т-клеток и (C) CD8⁺ Т-клеток, обнаруженных в образцах цельной крови 4 доноров после инкубации с указанными антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-huCLB-T3/4 и IgG1-b12. Процент (D) В-клеток, (E) CD4⁺ Т-клеток и (F) CD8⁺ Т-клеток, обнаруженных в образцах цельной крови 4 доноров после инкубации с указанными

антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-CD5-INSERM и IgG1-b12. Фракции рассчитывали как $[100\% \times (\text{количество клеток в образце}/\text{количество клеток в «образце без антител»}) \times (\text{количество гранулоцитов в «образце без антител»}/\text{количество гранулоцитов в образце})]$.

На Фигуре 39 показана совместная активация запрограммированной гибели раковых клеток с помощью антительных вариантов против DR4 и DR5, содержащих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и ингибируют (G237T) или усиливают (K326W-E333S) связывание с C1q. (A) Жизнеспособность клеток рака поджелудочной железы человека ВхРС-3 после 72-часовой инкубации с указанными вариантами антител. (B) Жизнеспособность клеток рака толстой кишки человека COLO 205 после 72-часовой инкубации с указанными вариантами антител. Процент жизнеспособных клеток рассчитывали по следующей формуле: $\% \text{ жизнеспособных клеток} = [(\text{люминесценция образца антитела} - \text{люминесценция образца стауроспорина})/(\text{люминесценция образца без антител} - \text{люминесценция образца стауроспорина})] * 100$. А; значение 100% на Фигуре 1 показывает селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + IgG1-11B8-E430G-S440K к CD52 путем введения мутации P329R. Клетки Wien 133 инкубировали с серией концентраций антител и концентраций в присутствии 20% объединенной нормальной сыворотки человека (NHS). Эффективность CDC представлена как (A) процент лизиса, определяемый процентным содержанием пропидий-йодид (PI)-положительных клеток, и (B) площадь под кривыми доза-ответ-реакция (AUC), нормированные на несвязывающее контрольное антитело IgG1-b12 (0%) и смесь IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%). На Фигуре 1 показана селективность активности CDC для смешанных антительных вариантов анти-IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K при введении мутации P329R. Клетки Wien 133 инкубировали с серией концентраций антител и концентраций в присутствии 20% объединенной нормальной сыворотки человека (NHS). Эффективность CDC представлена как (A) процент лизиса, определяемый процентным содержанием пропидий-йодид (PI)-положительных клеток, и (B) площадь под кривыми доза-ответ-реакция (AUC), нормированные на несвязывающее контрольное антитело IgG1-b12 (0%) и смесь IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 2 показана селективность активности CDC для смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K при введении мутации K322E. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как (A)

процент лизиса, определяемый процентом PI-положительных клеток, и (B) AUC, нормализованная к несвязывающемуся контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 3 показана избирательность активности CDC при введении мутации K322E в смешанные антительные варианты анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + анти-CD20-11B8-E430G-S440K в различных клеточных линиях. Анализы CDC *in vitro* проводили с 30 мкг/мл антител в присутствии 20% NHS с использованием клеточных линий лимфомы Беркитта Wien 133 (A), Daudi (B), Raji (C) и Ramos (D), острой лимфобластной лимфомы (ALL) клеточной линии REH (E), клеточной линии миеломы U266B1 (F) и клеточной линии В-клеточной лимфомы U-698-M (G). Активность CDC представлена как процент лизиса, определяемый процентом PI-положительных клеток, нормализованных к клеточной линии к несвязывающим контрольным антителам IgG1-b12 (0%) и IgG1-CAMPATH-1H-E430G (100%) для REH, U266B1, и Wien 133 или IgG1-11B8-E430G (100%) для Daudi, Raji, Ramos и U-698-M.

На Фигуре 4 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q (G236R, K322A, E269K, K322E или P329R) + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для смеси несвязывающихся контрольных антител IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 5 показана селективность активности CDC для смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией, усиливающей связывание с C1q (E333S, K326W или K326A/E333A). Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для смеси несвязывающихся контрольных антител IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 6 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R (A), K322A (B), E269K (C), K322E (D) или P329R (E) + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией, усиливающей связывание с C1q (E333S, K326W или K326A/E333A). Клетки Wien 133 инкубировали с сериями

концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для смеси несвязывающихся контрольных антител IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 7 показано связывание антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A (A, B), и антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией E333S (C, D), усиливающей связывание с C1q, с линиями клеток лимфомы человека Wien 133 (A, C) и Raji (B, D). Связывание антител тестировали с помощью проточной цитометрии. Связывание выражали как среднее геометрическое значение интенсивности флуоресценции (MFI). В качестве отрицательного контроля для связывания использовали образец без первичного антитела или несвязывающего анти-gp120 антитела IgG1-b12.

На Фигуре 8 показана ADCC-способность антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A, (A, C) и антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией, усиливающей связывание с C1q, E333S (B, D). (A, B) Был проведен репортерный биоанализ ADCC, в котором клетки-мишени Raji совместно инкубировали с серией разведений антител и человеческими Т-клетками Jurkat, стабильно экспрессирующими высокоаффинный FcγRIIIa (V158) и респонсивный элемент NFAT, управляющий экспрессией люциферазы светлячка. Продуцирование люциферазы количественно оценивали по люминесценции. (C, D) Был проведен анализ ADCC *in vitro* Europium TDA (EuTDA), в котором клетки-мишени Wien 133 совместно инкубировали с серией разведений антител и PBMC человека (E: T 100:1). Лизис клеток определяли путем измерения сигнала флуоресцентного хелата EuTDA в надосадочной жидкости.

На Фигуре 9 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов, Fc-Fc-взаимодействие усиливало анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A, + варианты Fc-Fc-взаимодействия усиливали анти-CD20 IgG1-11B8-S440K с или без мутации, усиливающей связывание с C1q, E333S. Тестируемые мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, представляли собой E430G, E345K, E345R и E345R-E430G. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и максимального лизиса. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-

E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 10 показана селективность активности CDC при использовании смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутациями, модулирующими связывание с C1q, в положении G236 (G236R или G236K) или положении G237 (G237A, G237T, G237Q или G237R), или двойной мутации G237A-K322A + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с или без мутации, модулирующей связывание с C1q, E333S, E333A, K326A, K326W-E333S, G237A или G237A-E333S. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и максимального лизиса. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 11 показана селективность активности CDC для вариантов изотипа смешанных антител (IgG1, IgG2, IgG3 и стабилизированный шарниром IgG4) анти-CD52 CAMPATH-1H-E430G-K439E с или без мутации ингибирования связывания с C1q G236R + анти-CD20 11B8-E430G-S440K, с или без мутации, усиливающей связывание с C1q, E333S. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 12 показана селективность активности CDC при использовании смешанных антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с или без мутации ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A, + анти-CD37 IgG1-CD37-37.3-E430G-S440K с или без мутации E333S, усиливающей связывание с C1q, на (A) клетках Daudi и (B) клетках Wien 133. Клетки-мишени инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-CD37-37.3-E430G (100%).

На Фигуре 13 показана DR5-опосредованная цитотоксичность (A) вариантов отдельного антитела или (B) смеси агонистов антительных вариантов анти-DR5 IgG1-DR5-01-G56T-E430G-K439E с или без мутации ингибирования связывания с C1q G236R + IgG1-DR5-05-E430G-S440K с или без мутации E333S, усиливающей связывание с C1q, на клетках рака поджелудочной железы человека VxPC-3. Проводили трехдневный анализ

жизнеспособности, при этом жизнеспособность клеток определяли с использованием набора CellTiter-Glo.

На Фигуре 14 показана активность CDC антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G с мутацией, модулирующей связывание с C1q, G237A, G236R, A327K, K322E или P329R. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12-S440K (0%; не показано) и IgG1-CAMPATH-1H-E430G (100%).

На Фигуре 15 показано связывание антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A (A, B, C), и антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией, усиливающей связывание с C1q, E333S (D, E, F) с FcRn человека. FcRn ELISA выполняли с 5 мкг/мл рекомбинантного внеклеточного домена FcRn человека (FcRnhsECDHis-B2M-BIO), нанесенного в виде покрытия, и серии разведений антител. Количество связанных антител определяли с помощью конъюгированного с HRP козьего антитела против IgG1 человека и хемилюминесцентного субстрата ABTS. Поглощение измеряли при 405 нм.

На Фигуре 16 показана скорость клиренса 500 мкг внутривенно введенного антитела у мышей SCID. (AC) Общий IgG человека в образцах плазмы определяли с помощью ELISA и наносили на график зависимости концентрации от времени для (A) вариантов IgG1-CAMPATH-1H, (B) вариантов IgG1-11B8 и (C) комбинаций вариантов IgG1-CAMPATH-1H + вариантов IgG1-11B8. Каждая точка данных представляет собой среднее +/- стандартное отклонение трех образцов. (D) Клиренс до 21 дня после введения антитела определяли по формуле $D \cdot 1000 / AUC$ с D, введенной дозой и AUC, площадью под кривой зависимости концентрации от времени.

На Фигуре 17 показано связывание иммобилизованных вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутациями ингибирования связывания с C1q G236R или G237T и вариантов IgG1-11B8-E430G-S440K с мутациями K326A или E333S, усиливающими связывание с C1q, с димерным His-меченным биотинилированным ECD из Fc γ R1A аллотипа 131H (A), Fc γ R1A аллотипа 131R (B), Fc γ R1B (C), Fc γ R1A аллотипа 158V (D) и Fc γ R1A аллотипа 158F (E), протестированных в анализах ELISA. Связывание представлено для образцов антител с концентрацией 20 мкг/мл относительно контроля без антител (фон) и связывания с IgG1-11B8-E430G-S440K (100%). Детекцию проводили с использованием Стрептавидин-полиHRP и ABTS.

На Фигуре 18 показана селективность активности CDC при использовании смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с или без мутации, ингибирующей связывание с C1q (G236R или G237T) + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией G237A, ингибирующей связывание с FcγR, с или без мутации E333S, усиливающей связывание с C1q. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и как лизис при 40 мкг/мл IgG. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 19 показана избирательная активность комбинаций вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в цельной крови, определенная анализом клеток крови с помощью проточной цитометрии. Оси Y: фракция В-клеток (CD19-положительные/CD3-отрицательные) или фракция Т-клеток (CD19-отрицательные/CD3-положительные) от общей популяции лимфоцитов (CD66b-отрицательные) после инкубации в присутствии эффекторных клеток. Ось X: разные группы обработки. Символы представляют клетки от пяти разных здоровых доноров, протестированных в двух отдельных инкубациях для каждого донора. (A) Селективная активность IgG1-CAMPATH-1H-G236R-E430G-K439E, смешанного с IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. (B) Селективная активность вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, содержащих дополнительную мутацию G237, в смеси с IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. (C) Селективная активность вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, содержащих дополнительную мутацию G236R или G237, смешанных с IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K, содержащим дополнительную мутацию E333S, усиливающую связывание с C1q. (D) Степень истощения В-клеток различными целевыми антителами для В-клеток по сравнению с взаимозависимыми комбинациями антител IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с дополнительными мутациями G236R, G237Q или G237R, смешанными с IgG1-11B8-G237A -E430G-S440K. Ось Y: представление в логарифмической шкале фракции В-клеток, определенной, как указано выше.

На Фигуре 20 показана селективность активности CDC на разных линиях клеток с разными уровнями экспрессии CD20 и CD52 за счет комбинации антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E и IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией, ингибирующей связывание с C1q в анти-CD52 компоненте и мутацией, усиливающей связывание с C1q в анти-CD20 компоненте. Анализы CDC *in vitro* проводили с 0,01-40 мкг/мл антитела в присутствии 20% NHS с использованием клеточных линий лимфомы

Беркитта Daudi (A), Raji (B) и Ramos (C), линии клеток ALL REH (D) и клеточной линии В-клеточной лимфомы U-698-M (E). Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и как максимальный лизис. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 21 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов анти-CD37 IgG1-CD37-37.3-E430G-K439E с или без мутации G236R, ингибирующей связывание с C1q, + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с или без мутации E333S, усиливающей связывание с C1q. (A) Клетки Daudi и (B) клетки WIL2-S инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и как лизис при 40 мкг/мл IgG. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CD37-37.3-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 22 показано **(A) связывание антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H с мутациями E430G или E345R, усиливающими взаимодействие Fc:Fc, мутацией K439E, ингибирующей самоолигомеризацию, в комбинации с любой из мутаций ингибиторования связывания FcγR и модуляции связывания с C1q, G236R, G237A или G237T, с клеточной линией лимфомы человека Wien 133. Связывание антител тестировали с помощью проточной цитометрии и представляли нормализованными относительно значения Vmax IgG1-Campath-1H дикого типа (100%). В качестве отрицательного контроля для связывания использовали несвязывающее анти-gp120 антитело IgG1-b12. (B) Максимальное связывание (Vmax) с клетками Raji антительных вариантов IgG1-Campath-1H с мутациями E430G и K439E, в комбинации с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, G236R, G237A или G237T, показано нормализованным относительно связывания IgG1-Campath-1H дикого типа (C) Кажущиеся значения Kd антительных вариантов IgG1-Campath-1H с мутациями E430G и S440K в сочетании с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, G236R, G237A или G237T, связывающихся с клетками Raji.**

На Фигуре 23 показано связывание антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8 с мутацией E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, мутацией S440K, ингибирующей самоолигомеризацию, в комбинации с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, K326A или E333A (A) или E333S, G237A или G237A-E333S (B) к линии клеток лимфомы человека Raji. Связывание антител тестировали с помощью проточной

цитометрии и представляли нормализованными относительно значения V_{max} IgG1-11B8 дикого типа (100%). В качестве отрицательного контроля для связывания использовали несвязывающее анти-gp120 антитело IgG1-b12. (C, D) Максимальное связывание (V_{max}) с клетками Raji антительными вариантами IgG1-11B8 с мутациями E430G и S440K, в сочетании с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, K326A или E333A (C) или E333S, G237A или G237A-E333S (D) показан нормализованным относительно связывания IgG1-11B8 дикого типа (E, F). Кажущиеся значения K_d антительных вариантов IgG1-11B8 с мутациями E430G и S440K в сочетании с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, K326A или E333A (E) или связывание E333S, G237A или G237A-E333S (F) с клетками Raji.

На Фигуре 24 показано связывание FcRn антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и анти-CD20 IgG1-11B8. (A, C) Связывание с FcRn человека показано для вариантов анти-CD52 антитела IgG1-CAMPATH-1H с мутацией E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, мутацией K439E, ингибирующей самоолигомеризацию, и мутациями, модулирующими связывание с C1q, G237A или G237T, с использованием концентрации антител 40 мкг/мл при (A) pH 6,0 или (C) pH 7,4. (B, D) Связывание с FcRn человека вариантами анти-CD20-антитела IgG1-11B8 с мутацией E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, мутацией S440K, ингибирующей самоолигомеризацию, и мутациями, модулирующими связывание с C1q, K326A, E333A, G237A или G237A-E333S, с использованием концентрации антител 40 мкг/мл при (B) pH 6,0 или (D) pH 7,4. FcRn ELISA выполняли с 2 мкг/мл покрытого рекомбинантным внеклеточным доменом FcRn человека (FcRnECDHis-B2M-BIO) и серии разведений антител. Количество связанных антител определяли с помощью конъюгированного с HRP козьего антитела против IgG1 человека и хемилюминесцентного субстрата ABTS. Поглощение измеряли при 405 нм.

На Фигуре 25 показаны концентрации общего IgG человека (hIgG), измеренные в образцах крови, взятых у мышей, которым инъецировали антительные варианты анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H или анти-IgG1-11B8 или их смеси. (A) Общая концентрация hIgG в образцах крови, собранных у мышей, которым инъецировали IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q или IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R дикого типа. (B) Общая концентрация hIgG в образцах крови, собранных у мышей, которым вводили IgG1-11B8 дикого типа, IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A или IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S. (C) Общая концентрация hIgG в образцах крови, собранных у мышей, которым инъецировали смеси IgG1-CAMPATH-1H дикого типа + IgG1-11B8 или смеси антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8, несущих мутации, как в (A) и (B). На всех фигурах пунктирная линия представляет прогнозируемую

концентрацию IgG1 во времени для антител IgG1 дикого типа у мышей SCID. (D) Клиренс до 21 дня после введения антитела определяли по формуле $D \cdot 1000 / AUC$ с D , введенной дозой и AUC , площадью под кривой зависимости концентрации от времени.

На Фигуре 26 показана концентрация C4d (в мкг/мл), обнаруженная в образцах, инкубированных с антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-11B8 и IgG1-b12, несущими мутации E430G, K439E или S440K и G236R, G237A, G237Q или G237R, после вычитания средней концентрации C4d, обнаруженной в образцах отрицательного контроля, не содержащих антител. Положительные контрольные образцы включают антительные варианты, несущие мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc E345R, E430G и S440Y (RGY).

На Фигуре 27 показано связывание с C1q с клетками Wien 133, инкубируемыми на льду с нормальной сывороткой человека в качестве источника комплемента, после опсонизации антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-11B8 и IgG1-b12, несущих мутации E430G, K439E или S440K и G236R, G237T, K326A или E333S, детектируемое с помощью проточной цитометрии. Средние значения интенсивности флуоресценции были нормализованы к контрольным реакциям без антител (0%) и верхнему уровню смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%), оцененного путем подбора логарифмической модели ответа агониста. (A) Связывание C1q контрольных реакций. (B-D) Связывание C1q (B) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E, (C) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E-G236R и (D) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E-G237R, смешанных с несвязывающим контролем IgG1-b12 или различными вариантами IgG1-11B8.

На Фигуре 28 показано связывание Fc γ R антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H-E430G и IgG1-11B8-E430G, несущих мутацию K439E или S440K, ингибирующую самоолигомеризацию, и мутации, модулирующие связывание с C1q. (A-E) Связывание вариантов иммобилизованных антител с димерными His-мечеными биотинилированными ECD, как было протестировано в анализах ELISA, (A) высокоаффинного аллотипа Fc γ RIIA 131H, (B) низкоаффинного аллотипа Fc γ RIIA 131R, (C) Fc γ RIIB, (D) высокоаффинного аллотипа Fc γ RIIA 158V или (E) низкоаффинного аллотипа Fc γ RIIA 158F. (F) Связывание иммобилизованного Fc γ RIa с вариантами антител, протестированными в ELISA. Связывание представлено для образцов антител с концентрацией 20 мкг/мл и было нормализовано для каждого эксперимента после вычитания сигналов в лунках, инкубированных без первичного антитела, относительно усредненного сигнала, наблюдаемого для IgG1-CAMPATH-1H дикого типа (100%). Детекцию проводили с использованием Стрептавидин-полиHRP и ABTS.

На Фигуре 29 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H, анти-CD20 IgG1-11B8 и анти-CD52 IgG1-h2E8 путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC измерялась в трех независимых экспериментах и представлена как (А) усредненная AUC, нормализованная к несвязывающемуся контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%) и (В) средний процент лизиса, определенный по положительности в анализе с пропидиум йодидом при концентрации антитела 40 мкг/мл.

На Фигуре 30 (А, В) показана эффективность CDC отдельного агента и комбинированных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G, анти-CD20 IgG1-11B8-E430G и неантигенсвязывающих антител IgG1-b12-E430G, несущих собственные мутации, ингибирующие олигомеризацию, и мутации, модулирующие связывание с C1q, как указано. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как AUC, нормализованная к несвязывающему контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 31 показана активация линий репортерных клеток Jurkat, стабильно экспрессирующих либо (А) FcγRIIa, либо (В) FcγRIIIa, при измерении по уровню люминесценции (RLU) при совместном культивировании с клетками лимфомы Raji и различными концентрациями антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8. Значения люминесценции были нормализованы для каждого эксперимента относительно тех, которые наблюдались для IgG1-b12 (0%) и IgG1-Campath-1H дикого типа + IgG1-11B8 дикого типа (100%), перед усреднением по трем (FcγRIIa) или двум (FcγRIIIa) **экспериментальным повторам.**

На Фигуре 32 показана взаимозависимая CDC на клетках Wien 133, индуцированный смесями антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8, несущих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q в неэквивалентных соотношениях. (А) Козависимая CDC, индуцированная смесями, содержащими эквивалентные и неэквивалентные отношения концентраций IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R и IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A. (В) Козависимая CDC, индуцированная смесями, содержащими эквивалентные и неэквивалентные отношения концентраций IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q и IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A.

На Фигуре 33 показана селективность активности CDC с помощью смесей антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H с вариантами анти-HLA-DR IgG1-HLA-DR-huL243 (А) или вариантами анти-HLA-DR IgG1-HLA-DR-1D09C3 (В) путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и ингибируют связывание с C1q. Клетки Osi-

Ly17 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как AUC, нормализованная к несвязывающемуся контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси (A) IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-HLA-DR-huL243-E430G (100%) или (B) IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-HLA-DR-1D09C3-E430G (100%).

На Фигуре 34 показана селективная взаимозависимая активность CDC смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и анти-CD20 IgG1-11B8 путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и ингибируют связывание с C1q. Эффективность CDC показана для вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с любой из мутаций L234A, L234A-L235A, L234F, L234F-L235E, L235A, L235Q, G236R или G237Q и смесей этих вариантов с несвязывающим контрольным антителом IgG1-b12 или IgG1-11B8-E430G-S440K. Эффективность CDC представлена как AUC, нормализованная к несвязывающему контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 35 показана селективная взаимозависимая активность CDC смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и анти-CD20 IgG1-11B8 путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и ингибируют связывание с C1q. (A) Эффективность CDC антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в виде отдельных агентов или их смесей, несущих мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345K, E345Q, E345R или E345Y, мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, и мутации, ингибирующие связывание с C1q, G236R или G237A. (B) Эффективность CDC антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в виде отдельных агентов или их смесей, несущих мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345Q, E345V или E345Y, мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, и мутации, ингибирующие связывание с C1q, G236R или G237A. (C) Эффективность CDC антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в виде отдельных агентов или их смесей, содержащих соответствующие мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345Q, E345V или E345Y, мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, и мутации, ингибирующие связывание с C1q, G236R или G237A. (D) Эффективность CDC антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в виде отдельных агентов или их смесей, несущих мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, E430G или K248E-T437R, мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, и мутации, ингибирующие связывание с C1q, G236R, G237A или E333S. Эффективность CDC представлена как AUC, нормализованная к несвязывающему контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-

CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 36 показан взаимозависимая CDC на клетках лимфомы Raji, индуцированный смесями антительных вариантов IgG1-CD37-37-3 и IgG1-11B8, несущих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q. (A) Относительные площади под кривой (AUC), нормализованные к минимальному лизису (0% с IgG1-b12) и максимальному лизису (100% со смесью IgG1-CD37-37-3-E430G + IgG1-11B8 -E430G) лизиса клеток, индуцированного указанными антительными вариантами в разведении или их смесями. (B) Максимальный процент лизиса, индуцированного указанными антительными вариантами и их смесями.

На Фигуре 37 показана селективная взаимозависимая активность CDC смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и анти-CD20 IgG1-11B8 путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q. Образцы CLL пациентов инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как процент жизнеспособных В-клеток при инкубации с вариантами антител. Показаны результаты с использованием образцов CLL от пациентов 1 (A), 2 (B) и 3 (C).

На Фигуре 38 показана фракция В-клеток, CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток, обнаруженная с помощью проточной цитометрии после инкубации образцов цельной крови со смесями антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-huCLB-T3/4 и IgG1-CD5-INSERM, несущих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q. Процент (A) В-клеток, (B) CD4+ Т-клеток и (C) CD8+ Т-клеток, обнаруженных в образцах цельной крови 4 доноров после инкубации с указанными антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-huCLB-T3/4 и IgG1-b12. Процент (D) В-клеток, (E) CD4+ Т-клеток и (F) CD8+ Т-клеток, обнаруженных в образцах цельной крови 4 доноров после инкубации с указанными антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-CD5-INSERM и IgG1-b12. Фракции рассчитывали как $[100\% \times (\text{количество клеток в образце} / \text{количество клеток в «образце без антител»}) \times (\text{количество гранулоцитов в «образце без антител»} / \text{количество гранулоцитов в образце})]$.

На Фигуре 39 показана совместная активация запрограммированной гибели раковых клеток с помощью антительных вариантов против DR4 и DR5, содержащих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и ингибируют (G237T) или усиливают (K326W-E333S) связывание с C1q. (A)

Жизнеспособность клеток рака поджелудочной железы человека VxPC-3 после 72-часовой инкубации с указанными вариантами антител. (B) Жизнеспособность клеток рака толстой кишки человека COLO 205 после 72-часовой инкубации с указанными вариантами антител. Процент жизнеспособных клеток рассчитывали по следующей формуле: % жизнеспособных клеток = $[(\text{люминесценция образца антитела} - \text{люминесценция образца стауроспорина}) / (\text{люминесценция образца без антител} - \text{люминесценция образца стауроспорина})] * 100$. B), который оказался более эффективным, чем отдельные антитела (рисунок 1 показывает избирательность активности CDC для смешанных антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K путем введения мутации P329R. Клетки Wien 133 инкубировали с серией концентраций антител и концентраций в присутствии 20% объединенной нормальной сыворотки человека (NHS). Эффективность CDC представлена как (A) процент лизиса, определяемый процентным содержанием пропидий-йодид (PI)-положительных клеток, и (B) площадь под кривыми доза-ответ-реакция (AUC), нормированные на несвязывающее контрольное антитело IgG1-b12 (0%) и смесь IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%). На Фигуре 1 показана селективность активности CDC для смешанных антительных вариантов анти-IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K при введении мутации P329R. Клетки Wien 133 инкубировали с серией концентраций антител и концентраций в присутствии 20% объединенной нормальной сыворотки человека (NHS). Эффективность CDC представлена как (A) процент лизиса, определяемый процентным содержанием пропидий-йодид (PI)-положительных клеток, и (B) площадь под кривыми доза-ответ-реакция (AUC), нормированные на несвязывающее контрольное антитело IgG1-b12 (0%) и смесь IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 2 показана селективность активности CDC для смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K при введении мутации K322E. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как (A) процент лизиса, определяемый процентом PI-положительных клеток, и (B) AUC, нормализованная к несвязывающемуся контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 3 показана избирательность активности CDC при введении мутации K322E в смешанные антительные варианты анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + анти-CD20-11B8-E430G-S440K в различных клеточных линиях. Анализы CDC *in vitro* проводили с 30 мкг/мл антител в присутствии 20% NHS с использованием клеточных

линий лимфомы Беркитта Wien 133 (A), Daudi (B), Raji (C) и Ramos (D), острой лимфобластной лимфомы (ALL) клеточной линии REH (E), клеточной линии миеломы U266B1 (F) и клеточной линии В-клеточной лимфомы U-698-M (G). Активность CDC представлена как процент лизиса, определяемый процентом PI-положительных клеток, нормализованных к клеточной линии к несвязывающим контрольным антителам IgG1-b12 (0%) и IgG1-CAMPATH-1H-E430G (100%) для REH, U266B1, и Wien 133 или IgG1-11B8-E430G (100%) для Daudi, Raji, Ramos и U-698-M.

На Фигуре 4 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q (G236R, K322A, E269K, K322E или P329R) + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для смеси несвязывающихся контрольных антител IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 5 показана селективность активности CDC для смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией, усиливающей связывание с C1q (E333S, K326W или K326A/E333A). Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для смеси несвязывающихся контрольных антител IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 6 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R (A), K322A (B), E269K (C), K322E (D) или P329R (E) + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией, усиливающей связывание с C1q (E333S, K326W или K326A/E333A). Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для смеси несвязывающихся контрольных антител IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 7 показано связывание антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R или

K322A (A, B), и антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией E333S (C, D), усиливающей связывание с C1q, с линиями клеток лимфомы человека Wien 133 (A, C) и Raji (B, D). Связывание антител тестировали с помощью проточной цитометрии. Связывание выражали как среднее геометрическое значение интенсивности флуоресценции (MFI). В качестве отрицательного контроля для связывания использовали образец без первичного антитела или несвязывающего анти-gp120 антитела IgG1-b12.

На Фигуре 8 показана ADCC-способность антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A, (A, C) и антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией, усиливающей связывание с C1q, E333S (B, D). (A, B) Был проведен репортерный биоанализ ADCC, в котором клетки-мишени Raji совместно инкубировали с серией разведений антител и человеческими Т-клетками Jurkat, стабильно экспрессирующими высокоаффинный FcγRIIIa (V158) и респонсивный элемент NFAT, управляющий экспрессией люциферазы светлячка. Продуцирование люциферазы количественно оценивали по люминесценции. (C, D) Был проведен анализ ADCC *in vitro* Europium TDA (EuTDA), в котором клетки-мишени Wien 133 совместно инкубировали с серией разведений антител и РВМС человека (Е: Т 100:1). Лизис клеток определяли путем измерения сигнала флуоресцентного хелата EuTDA в надосадочной жидкости.

На Фигуре 9 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов, Fc-Fc-взаимодействие усиливало анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A, + варианты Fc-Fc-взаимодействия усиливали анти-CD20 IgG1-11B8-S440K с или без мутации, усиливающей связывание с C1q, E333S. Тестируемые мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, представляли собой E430G, E345K, E345R и E345R-E430G. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и максимального лизиса. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 10 показана селективность активности CDC при использовании смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутациями, модулирующими связывание с C1q, в положении G236 (G236R или G236K) или положении G237 (G237A, G237T, G237Q или G237R), или двойной мутации G237A-K322A + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с или без мутации, модулирующей связывание с C1q, E333S, E333A, K326A, K326W-E333S, G237A или G237A-E333S.

Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и максимального лизиса. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 11 показана селективность активности CDC для вариантов изотипа смешанных антител (IgG1, IgG2, IgG3 и стабилизированный шарниром IgG4) анти-CD52 CAMPATH-1H-E430G-K439E с или без мутации ингибирования связывания с C1q G236R + анти-CD20 11B8-E430G-S440K, с или без мутации, усиливающей связывание с C1q, E333S. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 12 показана селективность активности CDC при использовании смешанных антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с или без мутации ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A, + анти-CD37 IgG1-CD37-37.3-E430G-S440K с или без мутации E333S, усиливающей связывание с C1q, на (А) клетках Daudi и (В) клетках Wien 133. Клетки-мишени инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-CD37-37.3-E430G (100%).

На Фигуре 13 показана DR5-опосредованная цитотоксичность (А) вариантов отдельного антитела или (В) смеси агонистов антительных вариантов анти-DR5 IgG1-DR5-01-G56T-E430G-K439E с или без мутации ингибирования связывания с C1q G236R + IgG1-DR5-05-E430G-S440K с или без мутации E333S, усиливающей связывание с C1q, на клетках рака поджелудочной железы человека VxPC-3. Проводили трехдневный анализ жизнеспособности, при этом жизнеспособность клеток определяли с использованием набора CellTiter-Glo.

На Фигуре 14 показана активность CDC антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G с мутацией, модулирующей связывание с C1q, G237A, G236R, A327K, K322E или P329R. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для

несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12-S440K (0%; не показано) и IgG1-CAMPATH-1H-E430G (100%).

На Фигуре 15 показано связывание антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A (A, B, C), и антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией, усиливающей связывание с C1q, E333S (D, E, F) с FcRn человека. FcRn ELISA выполняли с 5 мкг/мл рекомбинантного внеклеточного домена FcRn человека (FcRnhsECDHis-B2M-BIO), нанесенного в виде покрытия, и серии разведений антител. Количество связанных антител определяли с помощью конъюгированного с HRP козьего антитела против IgG1 человека и хемилюминесцентного субстрата ABTS. Поглощение измеряли при 405 нм.

На Фигуре 16 показана скорость клиренса 500 мкг внутривенно введенного антитела у мышей SCID. (AC) Общий IgG человека в образцах плазмы определяли с помощью ELISA и наносили на график зависимости концентрации от времени для (A) вариантов IgG1-CAMPATH-1H, (B) вариантов IgG1-11B8 и (C) комбинаций вариантов IgG1-CAMPATH-1H + вариантов IgG1-11B8. Каждая точка данных представляет собой среднее +/- стандартное отклонение трех образцов. (D) Клиренс до 21 дня после введения антитела определяли по формуле $D \cdot 1000 / AUC$ с D, введенной дозой и AUC, площадью под кривой зависимости концентрации от времени.

На Фигуре 17 показано связывание иммобилизованных вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутациями ингибирования связывания с C1q G236R или G237T и вариантов IgG1-11B8-E430G-S440K с мутациями K326A или E333S, усиливающими связывание с C1q, с димерным His-меченным биотинилированным ECD из Fc γ RIIA аллотипа 131H (A), Fc γ RIIA аллотипа 131R (B), Fc γ RIIB (C), Fc γ RIIA аллотипа 158V (D) и Fc γ RIIA аллотипа 158F (E), протестированных в анализах ELISA. Связывание представлено для образцов антител с концентрацией 20 мкг/мл относительно контроля без антител (фон) и связывания с IgG1-11B8-E430G-S440K (100%). Детекцию проводили с использованием Стрептавидин-полиHRP и ABTS.

На Фигуре 18 показана селективность активности CDC при использовании смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с или без мутации, ингибирующей связывание с C1q (G236R или G237T) + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией G237A, ингибирующей связывание с Fc γ R, с или без мутации E333S, усиливающей связывание с C1q. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных

клеток и как лизис при 40 мкг/мл IgG. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 19 показана избирательная активность комбинаций вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в цельной крови, определенная анализом клеток крови с помощью проточной цитометрии. Оси Y: фракция В-клеток (CD19-положительные/CD3-отрицательные) или фракция Т-клеток (CD19-отрицательные/CD3-положительные) от общей популяции лимфоцитов (CD66b-отрицательные) после инкубации в присутствии эффекторных клеток. Ось X: разные группы обработки. Символы представляют клетки от пяти разных здоровых доноров, протестированных в двух отдельных инкубациях для каждого донора. (A) Селективная активность IgG1-CAMPATH-1H-G236R-E430G-K439E, смешанного с IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. (B) Селективная активность вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, содержащих дополнительную мутацию G237, в смеси с IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. (C) Селективная активность вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, содержащих дополнительную мутацию G236R или G237, смешанных с IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K, содержащим дополнительную мутацию E333S, усиливающую связывание с C1q. (D) Степень истощения В-клеток различными целевыми антителами для В-клеток по сравнению с взаимозависимыми комбинациями антител IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с дополнительными мутациями G236R, G237Q или G237R, смешанными с IgG1-11B8-G237A -E430G-S440K. Ось Y: представление в логарифмической шкале фракции В-клеток, определенной, как указано выше.

На Фигуре 20 показана селективность активности CDC на разных линиях клеток с разными уровнями экспрессии CD20 и CD52 за счет комбинации антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E и IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией, ингибирующей связывание с C1q в анти-CD52 компоненте и мутацией, усиливающая связывание с C1q в анти-CD20 компоненте. Анализы CDC *in vitro* проводили с 0,01-40 мкг/мл антитела в присутствии 20% NHS с использованием клеточных линий лимфомы Беркитта Daudi (A), Raji (B) и Ramos (C), линии клеток ALL REH (D) и клеточной линии В-клеточной лимфомы U-698-M (E). Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и как максимальный лизис. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 21 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов анти-CD37 IgG1-CD37-37.3-E430G-K439E с или без мутации

G236R, ингибирующей связывание с C1q, + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с или без мутации E333S, усиливающей связывание с C1q. (A) Клетки Daudi и (B) клетки WIL2-S инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и как лизис при 40 мкг/мл IgG. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CD37-37.3-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 22 показано (A) связывание антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H с мутациями E430G или E345R, усиливающими взаимодействие Fc:Fc, мутацией K439E, ингибирующей самоолигомеризацию, в комбинации с любой из мутаций ингибиторования связывания FcγR и модуляции связывания с C1q, G236R, G237A или G237T, с клеточной линией лимфомы человека Wien 133. Связывание антител тестировали с помощью проточной цитометрии и представляли нормализованными относительно значения Vmax IgG1-Campath-1H дикого типа (100%). В качестве отрицательного контроля для связывания использовали несвязывающее анти-gp120 антитело IgG1-b12. (B) Максимальное связывание (Vmax) с клетками Raji антительных вариантов IgG1-Campath-1H с мутациями E430G и K439E, в комбинации с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, G236R, G237A или G237T, показано нормализованным относительно связывания IgG1-Campath-1H дикого типа (C) Кажущиеся значения Kd антительных вариантов IgG1-Campath-1H с мутациями E430G и S440K в сочетании с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, G236R, G237A или G237T, связывающихся с клетками Raji.

На Фигуре 23 показано связывание антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8 с мутацией E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, мутацией S440K, ингибирующей самоолигомеризацию, в комбинации с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, K326A или E333A (A) или E333S, G237A или G237A-E333S (B) к линии клеток лимфомы человека Raji. Связывание антител тестировали с помощью проточной цитометрии и представляли нормализованными относительно значения Vmax IgG1-11B8 дикого типа (100%). В качестве отрицательного контроля для связывания использовали несвязывающее анти-gp120 антитело IgG1-b12. (C, D) Максимальное связывание (Vmax) с клетками Raji антительными вариантами IgG1-11B8 с мутациями E430G и S440K, в сочетании с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, K326A или E333A (C) или E333S, G237A или G237A-E333S (D) показан нормализованным относительно связывания IgG1-11B8 дикого типа (E, F). Кажущиеся значения Kd антительных

вариантов IgG1-11B8 с мутациями E430G и S440K в сочетании с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, K326A или E333A (E) или связывание E333S, G237A или G237A-E333S (F) с клетками Raji.

На Фигуре 24 показано связывание FcRn антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и анти-CD20 IgG1-11B8. (A, C) Связывание с FcRn человека показано для вариантов анти-CD52 антитела IgG1-CAMPATH-1H с мутацией E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, мутацией K439E, ингибирующей самоолигомеризацию, и мутациями, модулирующими связывание с C1q, G237A или G237T, с использованием концентрации антител 40 мкг/мл при (A) pH 6,0 или (C) pH 7,4. (B, D) Связывание с FcRn человека вариантами анти-CD20-антитела IgG1-11B8 с мутацией E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, мутацией S440K, ингибирующей самоолигомеризацию, и мутациями, модулирующими связывание с C1q, K326A, E333A, G237A или G237A-E333S, с использованием концентрации антител 40 мкг/мл при (B) pH 6,0 или (D) pH 7,4. FcRn ELISA выполняли с 2 мкг/мл покрытого рекомбинантным внеклеточным доменом FcRn человека (FcRnECDHis-B2M-BIO) и серии разведений антител. Количество связанных антител определяли с помощью конъюгированного с HRP козьего антитела против IgG1 человека и хемилюминесцентного субстрата ABTS. Поглощение измеряли при 405 нм.

На Фигуре 25 показаны концентрации общего IgG человека (hIgG), измеренные в образцах крови, взятых у мышей, которым инъецировали антительные варианты анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H или анти-IgG1-11B8 или их смеси. (A) Общая концентрация hIgG в образцах крови, собранных у мышей, которым инъецировали IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q или IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R дикого типа. (B) Общая концентрация hIgG в образцах крови, собранных у мышей, которым вводили IgG1-11B8 дикого типа, IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A или IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S. (C) Общая концентрация hIgG в образцах крови, собранных у мышей, которым инъецировали смеси IgG1-CAMPATH-1H дикого типа + IgG1-11B8 или смеси антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8, несущих мутации, как в (A) и (B). На всех фигурах пунктирная линия представляет прогнозируемую концентрацию IgG1 во времени для антител IgG1 дикого типа у мышей SCID. (D) Клиренс до 21 дня после введения антитела определяли по формуле $D \cdot 1000 / AUC$ с D, введенной дозой и AUC, площадью под кривой зависимости концентрации от времени.

На Фигуре 26 показана концентрация C4d (в мкг/мл), обнаруженная в образцах, инкубированных с антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-11B8 и IgG1-b12, несущими мутации E430G, K439E или S440K и G236R, G237A, G237Q или G237R, после вычитания средней концентрации C4d, обнаруженной в образцах отрицательного

контроля, не содержащих антител. Положительные контрольные образцы включают антительные варианты, несущие мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc E345R, E430G и S440Y (RGY).

На Фигуре 27 показано связывание с C1q с клетками Wien 133, инкубируемыми на льду с нормальной сывороткой человека в качестве источника комплемента, после опсонизации антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-11B8 и IgG1-b12, несущих мутации E430G, K439E или S440K и G236R, G237T, K326A или E333S, детектируемое с помощью проточной цитометрии. Средние значения интенсивности флуоресценции были нормализованы к контрольным реакциям без антител (0%) и верхнему уровню смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%), оцененного путем подбора логарифмической модели ответа агониста. (A) Связывание C1q контрольных реакций. (B-D) Связывание C1q (B) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E, (C) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E-G236R и (D) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E-G237R, смешанных с несвязывающим контролем IgG1-b12 или различными вариантами IgG1-11B8.

На Фигуре 28 показано связывание Fc γ R антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H-E430G и IgG1-11B8-E430G, несущих мутацию K439E или S440K, ингибирующую самоолигомеризацию, и мутации, модулирующие связывание с C1q. (A-E) Связывание вариантов иммобилизованных антител с димерными His-мечеными биотинилированными ECD, как было протестировано в анализах ELISA, (A) высокоаффинного аллотипа Fc γ RIIA 131H, (B) низкоаффинного аллотипа Fc γ RIIA 131R, (C) Fc γ RIIB, (D) высокоаффинного аллотипа Fc γ RIIA 158V или (E) низкоаффинного аллотипа Fc γ RIIA 158F. (F) Связывание иммобилизованного Fc γ RIa с вариантами антител, протестированными в ELISA. Связывание представлено для образцов антител с концентрацией 20 мкг/мл и было нормализовано для каждого эксперимента после вычитания сигналов в лунках, инкубированных без первичного антитела, относительно усредненного сигнала, наблюдаемого для IgG1-CAMPATH-1H дикого типа (100%). Детекцию проводили с использованием Стрептавидин-полиHRP и ABTS.

На Фигуре 29 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H, анти-CD20 IgG1-11B8 и анти-CD52 IgG1-h2E8 путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулировать связывание с C1q. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC измерялась в трех независимых экспериментах и представлена как (A) усредненная AUC, нормализованная к несвязывающемуся контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и

смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%) и (B) средний процент лизиса, определенный по положительности в анализе с пропидиум йодидом при концентрации антитела 40 мкг/мл.

На Фигуре 30 (A, B) показана эффективность CDC отдельного агента и комбинированных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G, анти-CD20 IgG1-11B8-E430G и неантигенсвязывающих антител IgG1-b12-E430G, несущих собственные мутации, ингибирующие олигомеризацию, и мутации, модулирующие связывание с C1q, как указано. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как AUC, нормализованная к несвязывающему контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 31 показана активация линий репортерных клеток Jurkat, стабильно экспрессирующих либо (A) FcγRIIa, либо (B) FcγRIIIa, при измерении по уровню люминесценции (RLU) при совместном культивировании с клетками лимфомы Raji и различными концентрациями антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8. Значения люминесценции были нормализованы для каждого эксперимента относительно тех, которые наблюдались для IgG1-b12 (0%) и IgG1-Campath-1H дикого типа + IgG1-11B8 дикого типа (100%), перед усреднением по трем (FcγRIIa) или двум (FcγRIIIa) **экспериментальным повторам.**

На Фигуре 32 показана взаимозависимая CDC на клетках Wien 133, индуцированный смесями антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8, несущих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q в неэквиволярных соотношениях. (A) Козависимая CDC, индуцированная смесями, содержащими эквиволярные и неэквиволярные отношения концентраций IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R и IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A. (B) Козависимая CDC, индуцированная смесями, содержащими эквиволярные и неэквиволярные отношения концентраций IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q и IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A.

На Фигуре 33 показана селективность активности CDC с помощью смесей антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H с вариантами анти-HLA-DR IgG1-HLA-DR-huL243 (A) или вариантами анти-HLA-DR IgG1-HLA-DR-1D09C3 (B) путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и ингибируют связывание с C1q. Клетки Osi-Ly17 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как AUC, нормализованная к несвязывающемуся контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси (A) IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-HLA-DR-huL243-E430G (100%) или (B) IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-HLA-DR-1D09C3-E430G (100%).

На Фигуре 34 показана селективная взаимозависимая активность CDC смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и анти-CD20 IgG1-11B8 **путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и ингибируют связывание с C1q.**

Эффективность CDC показана для вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с любой из мутаций L234A, L234A-L235A, L234F, L234F-L235E, L235A, L235Q, G236R или G237Q и смесей этих вариантов с несвязывающим контрольным антителом IgG1-b12 или IgG1-11B8-E430G-S440K. Эффективность CDC представлена как AUC, нормализованная к несвязывающему контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 35 показана селективная взаимозависимая активность CDC смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и анти-CD20 IgG1-11B8 путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и ингибируют связывание с C1q. (A) Эффективность CDC антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в виде отдельных агентов или их смесей, несущих мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345K, E345Q, E345R или E345Y, мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, и мутации, ингибирующие связывание с C1q, G236R или G237A. (B) Эффективность CDC антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в виде отдельных агентов или их смесей, несущих мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345Q, E345V или E345Y, мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, и мутации, ингибирующие связывание с C1q, G236R или G237A. (C) Эффективность CDC антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в виде отдельных агентов или их смесей, содержащих соответствующие мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345Q, E345V или E345Y, мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, и мутации, ингибирующие связывание с C1q, G236R или G237A. (D) Эффективность CDC антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в виде отдельных агентов или их смесей, несущих мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, E430G или K248E-T437R, мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, и мутации, ингибирующие связывание с C1q, G236R, G237A или E333S. Эффективность CDC представлена как AUC, нормализованная к несвязывающему контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 36 показан взаимозависимая CDC на клетках лимфомы Raji, индуцированный смесями антительных вариантов IgG1-CD37-37-3 и IgG1-11B8, несущих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q. (A) Относительные площади под кривой (AUC), нормализованные к минимальному лизису (0% с IgG1-b12) и максимальному лизису (100% со смесью IgG1-CD37-37-3-E430G + IgG1-11B8 -E430G) лизиса клеток,

индуцированного указанными антительными вариантами в разведении или их смесями. (B) Максимальный процент лизиса, индуцированного указанными антительными вариантами и их смесями.

На Фигуре 37 показана селективная взаимозависимая активность CDC смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и анти-CD20 IgG1-11B8 путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q. Образцы CLL пациентов инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как процент жизнеспособных В-клеток при инкубации с вариантами антител. Показаны результаты с использованием образцов CLL от пациентов 1 (A), 2 (B) и 3 (C).

На Фигуре 38 показана фракция В-клеток, CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток, обнаруженная с помощью проточной цитометрии после инкубации образцов цельной крови со смесями антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-huCLB-T3/4 и IgG1-CD5-INSERM, несущих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q. Процент (A) В-клеток, (B) CD4+ Т-клеток и (C) CD8+ Т-клеток, обнаруженных в образцах цельной крови 4 доноров после инкубации с указанными антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-huCLB-T3/4 и IgG1-b12. Процент (D) В-клеток, (E) CD4+ Т-клеток и (F) CD8+ Т-клеток, обнаруженных в образцах цельной крови 4 доноров после инкубации с указанными антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-CD5-INSERM и IgG1-b12. Фракции рассчитывали как $[100\% \times (\text{количество клеток в образце} / \text{количество клеток в «образце без антител»}) \times (\text{количество гранулоцитов в «образце без антител»} / \text{количество гранулоцитов в образце})]$.

На Фигуре 39 показана совместная активация запрограммированной гибели раковых клеток с помощью антительных вариантов против DR4 и DR5, содержащих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и ингибируют (G237T) или усиливают (K326W-E333S) связывание с C1q. (A) Жизнеспособность клеток рака поджелудочной железы человека VxPC-3 после 72-часовой инкубации с указанными вариантами антител. (B) Жизнеспособность клеток рака толстой кишки человека COLO 205 после 72-часовой инкубации с указанными вариантами антител. Процент жизнеспособных клеток рассчитывали по следующей формуле: % жизнеспособных клеток = $[(\text{люминесценция образца антитела} - \text{люминесценция образца стауроспорина}) / (\text{люминесценция образца без антител} - \text{люминесценция образца стауроспорина})] \times 100$. (B). Когда IgG1-CAMPATH-1H-E430G тестировался как отдельный

агент, введение мутации K439E (SEQ ID NO 80) приводило к снижению эффективности CDC, а K439E-P329R (SEQ ID NO 100) приводило к полной потере активности CDC (На Фигуре 1 показана селективность активности CDC для смешанных антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + к CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K путем введения мутации P329R. Клетки Wien 133 инкубировали с серией концентраций антител и концентраций в присутствии 20% объединенной нормальной сыворотки человека (NHS). Эффективность CDC представлена как (A) процент лизиса, определяемый процентным содержанием пропидий-йодид (PI)-положительных клеток, и (B) площадь под кривыми доза-ответ-реакция (AUC), нормированные на несвязывающее контрольное антитело IgG1-b12 (0%) и смесь IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%). На Фигуре 1 показана селективность активности CDC для смешанных антительных вариантов анти-IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K при введении мутации P329R. Клетки Wien 133 инкубировали с серией концентраций антител и концентраций в присутствии 20% объединенной нормальной сыворотки человека (NHS). Эффективность CDC представлена как (A) процент лизиса, определяемый процентным содержанием пропидий-йодид (PI)-положительных клеток, и (B) площадь под кривыми доза-ответ-реакция (AUC), нормированные на несвязывающее контрольное антитело IgG1-b12 (0%) и смесь IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 2 показана селективность активности CDC для смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K при введении мутации K322E. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как (A) процент лизиса, определяемый процентом PI-положительных клеток, и (B) AUC, нормализованная к несвязывающемуся контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 3 показана избирательность активности CDC при введении мутации K322E в смешанные антительные варианты анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + анти-CD20-11B8-E430G-S440K в различных клеточных линиях. Анализы CDC *in vitro* проводили с 30 мкг/мл антител в присутствии 20% NHS с использованием клеточных линий лимфомы Беркитта Wien 133 (A), Daudi (B), Raji (C) и Ramos (D), острой лимфобластной лимфомы (ALL) клеточной линии REH (E), клеточной линии миеломы U266B1 (F) и клеточной линии В-клеточной лимфомы U-698-M (G). Активность CDC представлена как процент лизиса, определяемый процентом PI-положительных клеток, нормализованных к клеточной линии к несвязывающим контрольным антителам IgG1-b12

(0%) и IgG1-CAMPATH-1H-E430G (100%) для REN, U266B1, и Wien 133 или IgG1-11B8-E430G (100%) для Daudi, Raji, Ramos и U-698-M.

На Фигуре 4 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q (G236R, K322A, E269K, K322E или P329R) + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для смеси несвязывающихся контрольных антител IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 5 показана селективность активности CDC для смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией, усиливающей связывание с C1q (E333S, K326W или K326A/E333A). Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для смеси несвязывающихся контрольных антител IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 6 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R (A), K322A (B), E269K (C), K322E (D) или P329R (E) + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией, усиливающей связывание с C1q (E333S, K326W или K326A/E333A). Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для смеси несвязывающихся контрольных антител IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 7 показано связывание антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A (A, B), и антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией E333S (C, D), усиливающей связывание с C1q, с линиями клеток лимфомы человека Wien 133 (A, C) и Raji (B, D). Связывание антител тестировали с помощью проточной цитометрии. Связывание выражали как среднее геометрическое значение интенсивности флуоресценции (MFI). В качестве отрицательного контроля для связывания использовали

образец без первичного антитела или несвязывающего анти-gp120 антитела IgG1-b12.

На Фигуре 8 показана ADCC-способность антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A, (A, C) и антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией, усиливающей связывание с C1q, E333S (B, D). (A, B) Был проведен репортерный биоанализ ADCC, в котором клетки-мишени Raji совместно инкубировали с серией разведений антител и человеческими Т-клетками Jurkat, стабильно экспрессирующими высокоаффинный FcγRIIIa (V158) и респонсивный элемент NFAT, управляющий экспрессией люциферазы светлячка. Продуцирование люциферазы количественно оценивали по люминесценции. (C, D) Был проведен анализ ADCC *in vitro* Europium TDA (EuTDA), в котором клетки-мишени Wien 133 совместно инкубировали с серией разведений антител и PBMC человека (E: T 100:1). Лизис клеток определяли путем измерения сигнала флуоресцентного хелата EuTDA в надосадочной жидкости.

На Фигуре 9 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов, Fc-Fc-взаимодействие усиливало анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A, + варианты Fc-Fc-взаимодействия усиливали анти-CD20 IgG1-11B8-S440K с или без мутации, усиливающей связывание с C1q, E333S. Тестируемые мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, представляли собой E430G, E345K, E345R и E345R-E430G. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и максимального лизиса. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 10 показана селективность активности CDC при использовании смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутациями, модулирующими связывание с C1q, в положении G236 (G236R или G236K) или положении G237 (G237A, G237T, G237Q или G237R), или двойной мутации G237A-K322A + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с или без мутации, модулирующей связывание с C1q, E333S, E333A, K326A, K326W-E333S, G237A или G237A-E333S. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и максимального лизиса. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 11 показана селективность активности CDC для вариантов изогибрида смешанных антител (IgG1, IgG2, IgG3 и стабилизированный шарниром IgG4) анти-CD52 CAMPATH-1H-E430G-K439E с или без мутации ингибирования связывания с C1q G236R + анти-CD20 11B8-E430G-S440K, с или без мутации, усиливающей связывание с C1q, E333S. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 12 показана селективность активности CDC при использовании смешанных антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с или без мутации ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A, + анти-CD37 IgG1-CD37-37.3-E430G-S440K с или без мутации E333S, усиливающей связывание с C1q, на (А) клетках Daudi и (В) клетках Wien 133. Клетки-мишени инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-CD37-37.3-E430G (100%).

На Фигуре 13 показана DR5-опосредованная цитотоксичность (А) вариантов отдельного антитела или (В) смеси агонистов антительных вариантов анти-DR5 IgG1-DR5-01-G56T-E430G-K439E с или без мутации ингибирования связывания с C1q G236R + IgG1-DR5-05-E430G-S440K с или без мутации E333S, усиливающей связывание с C1q, на клетках рака поджелудочной железы человека ВхРС-3. Проводили трехдневный анализ жизнеспособности, при этом жизнеспособность клеток определяли с использованием набора CellTiter-Glo.

На Фигуре 14 показана активность CDC антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G с мутацией, модулирующей связывание с C1q, G237A, G236R, A327K, K322E или P329R. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12-S440K (0%; не показано) и IgG1-CAMPATH-1H-E430G (100%).

На Фигуре 15 показано связывание антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A (А, В, С), и антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с

мутацией, усиливающей связывание с C1q, E333S (D, E, F) с FcRn человека. FcRn ELISA выполняли с 5 мкг/мл рекомбинантного внеклеточного домена FcRn человека (FcRnhsECDHis-B2M-BIO), нанесенного в виде покрытия, и серии разведений антител. Количество связанных антител определяли с помощью конъюгированного с HRP козьего антитела против IgG1 человека и хемилюминесцентного субстрата ABTS. Поглощение измеряли при 405 нм.

На Фигуре 16 показана скорость клиренса 500 мкг внутривенно введенного антитела у мышей SCID. (AC) Общий IgG человека в образцах плазмы определяли с помощью ELISA и наносили на график зависимости концентрации от времени для (A) вариантов IgG1-CAMPATH-1H, (B) вариантов IgG1-11B8 и (C) комбинаций вариантов IgG1-CAMPATH-1H + вариантов IgG1-11B8. Каждая точка данных представляет собой среднее +/- стандартное отклонение трех образцов. (D) Клиренс до 21 дня после введения антитела определяли по формуле $D*1000/AUC$ с D, введенной дозой и AUC, площадью под кривой зависимости концентрации от времени.

На Фигуре 17 показано связывание иммобилизованных вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутациями ингибирования связывания с C1q G236R или G237T и вариантов IgG1-11B8-E430G-S440K с мутациями K326A или E333S, усиливающими связывание с C1q, с димерным His-меченным биотинилированным ECD из FcγRIIA аллотипа 131H (A), FcγRIIA аллотипа 131R (B), FcγRIIB (C), FcγRIIA аллотипа 158V (D) и FcγRIIA аллотипа 158F (E), протестированных в анализах ELISA. Связывание представлено для образцов антител с концентрацией 20 мкг/мл относительно контроля без антител (фон) и связывания с IgG1-11B8-E430G-S440K (100%). Детекцию проводили с использованием Стрептавидин-полиHRP и ABTS.

На Фигуре 18 показана селективность активности CDC при использовании смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с или без мутации, ингибирующей связывание с C1q (G236R или G237T) + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией G237A, ингибирующей связывание с FcγR, с или без мутации E333S, усиливающей связывание с C1q. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и как лизис при 40 мкг/мл IgG. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 19 показана избирательная активность комбинаций вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в цельной крови, определенная анализом клеток крови с

помощью проточной цитометрии. Ось Y: фракция В-клеток (CD19-положительные/CD3-отрицательные) или фракция Т-клеток (CD19-отрицательные/CD3-положительные) от общей популяции лимфоцитов (CD66b-отрицательные) после инкубации в присутствии эффекторных клеток. Ось X: разные группы обработки. Символы представляют клетки от пяти разных здоровых доноров, протестированных в двух отдельных инкубациях для каждого донора. (A) Селективная активность IgG1-CAMPATH-1H-G236R-E430G-K439E, смешанного с IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. (B) Селективная активность вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, содержащих дополнительную мутацию G237, в смеси с IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. (C) Селективная активность вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, содержащих дополнительную мутацию G236R или G237, смешанных с IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K, содержащим дополнительную мутацию E333S, усиливающую связывание с C1q. (D) Степень истощения В-клеток различными целевыми антителами для В-клеток по сравнению с взаимозависимыми комбинациями антител IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с дополнительными мутациями G236R, G237Q или G237R, смешанными с IgG1-11B8-G237A -E430G-S440K. Ось Y: представление в логарифмической шкале фракции В-клеток, определенной, как указано выше.

На Фигуре 20 показана селективность активности CDC на разных линиях клеток с разными уровнями экспрессии CD20 и CD52 за счет комбинации антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E и IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией, ингибирующей связывание с C1q в анти-CD52 компоненте и мутацией, усиливающая связывание с C1q в анти-CD20 компоненте. Анализы CDC *in vitro* проводили с 0,01-40 мкг/мл антитела в присутствии 20% NHS с использованием клеточных линий лимфомы Беркитта Daudi (A), Raji (B) и Ramos (C), линии клеток ALL REH (D) и клеточной линии В-клеточной лимфомы U-698-M (E). Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и как максимальный лизис. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 21 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов анти-CD37 IgG1-CD37-37.3-E430G-K439E с или без мутации G236R, ингибирующей связывание с C1q, + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с или без мутации E333S, усиливающей связывание с C1q. (A) Клетки Daudi и (B) клетки WIL2-S инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и как лизис при 40 мкг/мл IgG. Нормализацию проводили для

несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CD37-37.3-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 22 показано **(А)** связывание антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H с мутациями E430G или E345R, усиливающими взаимодействие Fc:Fc, мутацией K439E, ингибирующей самоолигомеризацию, в комбинации с любой из мутаций ингибирования связывания FcγR и модуляции связывания с C1q, G236R, G237A или G237T, с клеточной линией лимфомы человека Wien 133.

Связывание антител тестировали с помощью проточной цитометрии и представляли нормализованными относительно значения V_{max} IgG1-Campath-1H дикого типа (100%). В качестве отрицательного контроля для связывания использовали несвязывающее анти-gp120 антитело IgG1-b12. **(В)** Максимальное связывание (V_{max}) с клетками Raji антительных вариантов IgG1-Campath-1H с мутациями E430G и K439E, в комбинации с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, G236R, G237A или G237T, показано нормализованным относительно связывания IgG1-Campath-1H дикого типа **(С)** Кажущиеся значения K_d антительных вариантов IgG1-Campath-1H с мутациями E430G и S440K в сочетании с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, G236R, G237A или G237T, связывающихся с клетками Raji.

На Фигуре 23 показано связывание антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8 с мутацией E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, мутацией S440K, ингибирующей самоолигомеризацию, в комбинации с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, K326A или E333A **(А)** или E333S, G237A или G237A-E333S **(В)** к линии клеток лимфомы человека Raji. Связывание антител тестировали с помощью проточной цитометрии и представляли нормализованными относительно значения V_{max} IgG1-11B8 дикого типа (100%). В качестве отрицательного контроля для связывания использовали несвязывающее анти-gp120 антитело IgG1-b12. **(С, D)** Максимальное связывание (V_{max}) с клетками Raji антительными вариантами IgG1-11B8 с мутациями E430G и S440K, в сочетании с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, K326A или E333A **(С)** или E333S, G237A или G237A-E333S **(D)** показан нормализованным относительно связывания IgG1-11B8 дикого типа **(Е, F)**. Кажущиеся значения K_d антительных вариантов IgG1-11B8 с мутациями E430G и S440K в сочетании с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, K326A или E333A **(Е)** или связывание E333S, G237A или G237A-E333S **(F)** с клетками Raji.

На Фигуре 24 показано связывание FcRn антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и анти-CD20 IgG1-11B8. **(А, С)** Связывание с FcRn человека показано для

вариантов анти-CD52 антитела IgG1-CAMPATH-1H с мутацией E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, мутацией K439E, ингибирующей самоолигомеризацию, и мутациями, модулирующими связывание с C1q, G237A или G237T, с использованием концентрации антител 40 мкг/мл при (A) pH 6,0 или (C) pH 7,4. (B, D) Связывание с FcRn человека вариантами анти-CD20-антитела IgG1-11B8 с мутацией E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, мутацией S440K, ингибирующей самоолигомеризацию, и мутациями, модулирующими связывание с C1q, K326A, E333A, G237A или G237A-E333S, с использованием концентрации антител 40 мкг/мл при (B) pH 6,0 или (D) pH 7,4. FcRn ELISA выполняли с 2 мкг/мл покрытого рекомбинантным внеклеточным доменом FcRn человека (FcRnECDHis-B2M-BIO) и серии разведений антител. Количество связанных антител определяли с помощью конъюгированного с HRP козьего антитела против IgG1 человека и хемилюминесцентного субстрата ABTS. Поглощение измеряли при 405 нм.

На Фигуре 25 показаны концентрации общего IgG человека (hIgG), измеренные в образцах крови, взятых у мышей, которым инъецировали антительные варианты анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H или анти-IgG1-11B8 или их смеси. (A) Общая концентрация hIgG в образцах крови, собранных у мышей, которым инъецировали IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q или IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R дикого типа. (B) Общая концентрация hIgG в образцах крови, собранных у мышей, которым вводили IgG1-11B8 дикого типа, IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A или IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S. (C) Общая концентрация hIgG в образцах крови, собранных у мышей, которым инъецировали смеси IgG1-CAMPATH-1H дикого типа + IgG1-11B8 или смеси антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8, несущих мутации, как в (A) и (B). На всех фигурах пунктирная линия представляет прогнозируемую концентрацию IgG1 во времени для антител IgG1 дикого типа у мышей SCID. (D) Клиренс до 21 дня после введения антитела определяли по формуле $D \cdot 1000 / AUC$ с D, введенной дозой и AUC, площадью под кривой зависимости концентрации от времени.

На Фигуре 26 показана концентрация C4d (в мкг/мл), обнаруженная в образцах, инкубированных с антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-11B8 и IgG1-b12, несущими мутации E430G, K439E или S440K и G236R, G237A, G237Q или G237R, после вычитания средней концентрации C4d, обнаруженной в образцах отрицательного контроля, не содержащих антител. Положительные контрольные образцы включают антительные варианты, несущие мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc E345R, E430G и S440Y (RGY).

На Фигуре 27 показано связывание с C1q с клетками Wien 133, инкубируемыми на льду с нормальной сывороткой человека в качестве источника комплемента, после

опсонизации антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-11B8 и IgG1-b12, несущих мутации E430G, K439E или S440K и G236R, G237T, K326A или E333S, детектируемое с помощью проточной цитометрии. Средние значения интенсивности флуоресценции были нормализованы к контрольным реакциям без антител (0%) и верхнему уровню смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%), оцененного путем подбора логарифмической модели ответа агониста. (A) Связывание C1q контрольных реакций. (B-D) Связывание C1q (B) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E, (C) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E-G236R и (D) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E-G237R, смешанных с несвязывающим контролем IgG1-b12 или различными вариантами IgG1-11B8.

На Фигуре 28 показано связывание FcγR антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H-E430G и IgG1-11B8-E430G, несущих мутацию K439E или S440K, ингибирующую самоолигомеризацию, и мутации, модулирующие связывание с C1q. (A-E) Связывание вариантов иммобилизованных антител с димерными His-меченными биотинилированными ECD, как было протестировано в анализах ELISA, (A) высокоаффинного аллотипа FcγRIIA 131H, (B) низкоаффинного аллотипа FcγRIIA 131R, (C) FcγRIIB, (D) высокоаффинного аллотипа FcγRIIA 158V или (E) низкоаффинного аллотипа FcγRIIA 158F. (F) Связывание иммобилизованного FcγRIa с вариантами антител, протестированными в ELISA. Связывание представлено для образцов антител с концентрацией 20 мкг/мл и было нормализовано для каждого эксперимента после вычитания сигналов в лунках, инкубированных без первичного антитела, относительно усредненного сигнала, наблюдаемого для IgG1-CAMPATH-1H дикого типа (100%). Детекцию проводили с использованием Стрептавидин-полиHRP и ABTS.

На Фигуре 29 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H, анти-CD20 IgG1-11B8 и анти-CD52 IgG1-h2E8 путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулировать связывание с C1q. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC измерялась в трех независимых экспериментах и представлена как (A) усредненная AUC, нормализованная к несвязывающемуся контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%) и (B) средний процент лизиса, определенный по положительности в анализе с пропидиум йодидом при концентрации антитела 40 мкг/мл.

На Фигуре 30 (А, В) показана эффективность CDC отдельного агента и комбинированных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G, анти-CD20 IgG1-11B8-E430G и неантигенсвязывающих антител IgG1-b12-E430G, несущих собственные мутации, ингибирующие олигомеризацию, и мутации, модулирующие связывание с C1q, как указано. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как AUC, нормализованная к несвязывающему контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 31 показана активация линий репортерных клеток Jurkat, стабильно экспрессирующих либо (А) FcγRIIa, либо (В) FcγRIIIa, при измерении по уровню люминесценции (RLU) при совместном культивировании с клетками лимфомы Raji и различными концентрациями антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8. Значения люминесценции были нормализованы для каждого эксперимента относительно тех, которые наблюдались для IgG1-b12 (0%) и IgG1-Campath-1H дикого типа + IgG1-11B8 дикого типа (100%), перед усреднением по трем (FcγRIIa) или двум (FcγRIIIa) **экспериментальным повторам**.

На Фигуре 32 показана взаимозависимая CDC на клетках Wien 133, индуцированный смесями антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8, несущих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q в неэквиволярных соотношениях. (А) Козависимая CDC, индуцированная смесями, содержащими эквиволярные и неэквиволярные отношения концентраций IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R и IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A. (В) Козависимая CDC, индуцированная смесями, содержащими эквиволярные и неэквиволярные отношения концентраций IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q и IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A.

На Фигуре 33 показана селективность активности CDC с помощью смесей антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H с вариантами анти-HLA-DR IgG1-HLA-DR-huL243 (А) или вариантами анти-HLA-DR IgG1-HLA-DR-1D09C3 (В) путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и ингибируют связывание с C1q. Клетки Oci-Ly17 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как AUC, нормализованная к несвязывающемуся контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси (А) IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-HLA-DR-huL243-E430G (100%) или (В) IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-HLA-DR-1D09C3-E430G (100%).

На Фигуре 34 показана селективная взаимозависимая активность CDC смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и анти-CD20 IgG1-11B8 путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и ингибируют связывание с C1q. Эффективность CDC показана для вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с любой из мутаций L234A, L234A-L235A, L234F, L234F-L235E, L235A, L235Q, G236R или G237Q и смесей этих вариантов с несвязывающим контрольным антителом IgG1-b12 или IgG1-11B8-E430G-S440K. Эффективность CDC представлена как AUC, нормализованная к

несвязывающему контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 35 показана селективная взаимозависимая активность CDC смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и анти-CD20 IgG1-11B8 путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и ингибируют связывание с C1q. (A) Эффективность CDC антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в виде отдельных агентов или их смесей, несущих мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345K, E345Q, E345R или E345Y, мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, и мутации, ингибирующие связывание с C1q, G236R или G237A. (B) Эффективность CDC антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в виде отдельных агентов или их смесей, несущих мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345Q, E345V или E345Y, мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, и мутации, ингибирующие связывание с C1q, G236R или G237A. (C) Эффективность CDC антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в виде отдельных агентов или их смесей, содержащих соответствующие мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345Q, E345V или E345Y, мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, и мутации, ингибирующие связывание с C1q, G236R или G237A. (D) Эффективность CDC антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в виде отдельных агентов или их смесей, несущих мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, E430G или K248E-T437R, мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, и мутации, ингибирующие связывание с C1q, G236R, G237A или E333S. Эффективность CDC представлена как AUC, нормализованная к несвязывающему контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 36 показан взаимозависимая CDC на клетках лимфомы Raji, индуцированный смесями антительных вариантов IgG1-CD37-37-3 и IgG1-11B8, несущих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q. (A) Относительные площади под кривой (AUC), нормализованные к минимальному лизису (0% с IgG1-b12) и максимальному лизису (100% со смесью IgG1-CD37-37-3-E430G + IgG1-11B8 -E430G) лизиса клеток, индуцированного указанными антительными вариантами в разведении или их смесями. (B) Максимальный процент лизиса, индуцированного указанными антительными вариантами и их смесями.

На Фигуре 37 показана селективная взаимозависимая активность CDC смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и анти-CD20 IgG1-11B8 путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q. Образцы CLL пациентов инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как процент жизнеспособных В-клеток при инкубации с вариантами антител. Показаны результаты с использованием образцов CLL от пациентов 1 (А), 2 (В) и 3 (С).

На Фигуре 38 показана фракция В-клеток, CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток, обнаруженная с помощью проточной цитометрии после инкубации образцов цельной крови со смесями антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-huCLB-T3/4 и IgG1-CD5-INSERM, несущих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q. Процент (А) В-клеток, (В) CD4+ Т-клеток и (С) CD8+ Т-клеток, обнаруженных в образцах цельной крови 4 доноров после инкубации с указанными антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-huCLB-T3/4 и IgG1-b12. Процент (D) В-клеток, (E) CD4+ Т-клеток и (F) CD8+ Т-клеток, обнаруженных в образцах цельной крови 4 доноров после инкубации с указанными антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-CD5-INSERM и IgG1-b12. Фракции рассчитывали как $[100\% \times (\text{количество клеток в образце} / \text{количество клеток в «образце без антител»}) \times (\text{количество гранулоцитов в «образце без антител»} / \text{количество гранулоцитов в образце})]$.

На Фигуре 39 показана совместная активация запрограммированной гибели раковых клеток с помощью антительных вариантов против DR4 и DR5, содержащих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и ингибируют (G237T) или усиливают (K326W-E333S) связывание с C1q. (А) Жизнеспособность клеток рака поджелудочной железы человека VxPC-3 после 72-часовой инкубации с указанными вариантами антител. (В) Жизнеспособность клеток рака толстой кишки человека COLO 205 после 72-часовой инкубации с указанными вариантами антител. Процент жизнеспособных клеток рассчитывали по следующей формуле: $\% \text{ жизнеспособных клеток} = [(\text{люминесценция образца антитела} - \text{люминесценция образца стауроспорина}) / (\text{люминесценция образца без антител} - \text{люминесценция образца стауроспорина})] \times 100$. А-В). Для IgG1-11B8-E430G введение либо мутации S440K (SEQ ID NO 101), либо S440K-P329R (SEQ ID NO 114) привело к потере эффективности CDC (Фиг.1 показывает селективность активности CDC смешанными антительными вариантами анти- CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + анти-CD20 IgG1-11B8-

E430G-S440K путем введения мутации P329R. Клетки Wien 133 инкубировали с серией концентраций антител и концентраций в присутствии 20% объединенной нормальной сыворотки человека (NHS). Эффективность CDC представлена как (A) процент лизиса, определяемый процентным содержанием пропидий-йодид (PI)-положительных клеток, и (B) площадь под кривыми доза-ответ-реакция (AUC), нормированные на несвязывающее контрольное антитело IgG1-b12 (0%) и смесь IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%). На Фигуре 1 показана селективность активности CDC для смешанных антительных вариантов анти-IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K при введении мутации P329R. Клетки Wien 133 инкубировали с серией концентраций антител и концентраций в присутствии 20% объединенной нормальной сыворотки человека (NHS). Эффективность CDC представлена как (A) процент лизиса, определяемый процентным содержанием пропидий-йодид (PI)-положительных клеток, и (B) площадь под кривыми доза-ответ-реакция (AUC), нормированные на несвязывающее контрольное антитело IgG1-b12 (0%) и смесь IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 2 показана селективность активности CDC для смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K при введении мутации K322E. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как (A) процент лизиса, определяемый процентом PI-положительных клеток, и (B) AUC, нормализованная к несвязывающемуся контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 3 показана избирательность активности CDC при введении мутации K322E в смешанные антительные варианты анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + анти-CD20-11B8-E430G-S440K в различных клеточных линиях. Анализы CDC *in vitro* проводили с 30 мкг/мл антител в присутствии 20% NHS с использованием клеточных линий лимфомы Беркитта Wien 133 (A), Daudi (B), Raji (C) и Ramos (D), острой лимфобластной лимфомы (ALL) клеточной линии REH (E), клеточной линии миеломы U266B1 (F) и клеточной линии В-клеточной лимфомы U-698-M (G). Активность CDC представлена как процент лизиса, определяемый процентом PI-положительных клеток, нормализованных к клеточной линии к несвязывающим контрольным антителам IgG1-b12 (0%) и IgG1-CAMPATH-1H-E430G (100%) для REH, U266B1, и Wien 133 или IgG1-11B8-E430G (100%) для Daudi, Raji, Ramos и U-698-M.

На Фигуре 4 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией

ингибирования связывания с C1q (G236R, K322A, E269K, K322E или P329R) + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для смеси несвязывающихся контрольных антител IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 5 показана селективность активности CDC для смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией, усиливающей связывание с C1q (E333S, K326W или K326A/E333A). Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для смеси несвязывающихся контрольных антител IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 6 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R (A), K322A (B), E269K (C), K322E (D) или P329R (E) + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией, усиливающей связывание с C1q (E333S, K326W или K326A/E333A). Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для смеси несвязывающихся контрольных антител IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 7 показано связывание антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A (A, B), и антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией E333S (C, D), усиливающей связывание с C1q, с линиями клеток лимфомы человека Wien 133 (A, C) и Raji (B, D). Связывание антител тестировали с помощью проточной цитометрии. Связывание выражали как среднее геометрическое значение интенсивности флуоресценции (MFI). В качестве отрицательного контроля для связывания использовали образец без первичного антитела или несвязывающего анти-gp120 антитела IgG1-b12.

На Фигуре 8 показана ADCC-способность антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A, (A, C) и антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией,

усиливающей связывание с C1q, E333S (B, D). (A, B) Был проведен репортерный биоанализ ADCC, в котором клетки-мишени Raji совместно инкубировали с серией разведений антител и человеческими Т-клетками Jurkat, стабильно экспрессирующими высокоаффинный FcγRIIIa (V158) и респонсивный элемент NFAT, управляющий экспрессией люциферазы светлячка. Продуцирование люциферазы количественно оценивали по люминесценции. (C, D) Был проведен анализ ADCC in vitro Europium TDA (EuTDA), в котором клетки-мишени Wien 133 совместно инкубировали с серией разведений антител и РВМС человека (Е: Т 100:1). Лизис клеток определяли путем измерения сигнала флуоресцентного хелата EuTDA в надосадочной жидкости.

На Фигуре 9 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов, Fc-Fc-взаимодействие усиливало анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A, + варианты Fc-Fc-взаимодействия усиливали анти-CD20 IgG1-11B8- S440K с или без мутации, усиливающей связывание с C1q, E333S. Тестируемые мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, представляли собой E430G, E345K, E345R и E345R-E430G. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и максимального лизиса. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 10 показана селективность активности CDC при использовании смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутациями, модулирующими связывание с C1q, в положении G236 (G236R или G236K) или положении G237 (G237A, G237T, G237Q или G237R), или двойной мутации G237A-K322A + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с или без мутации, модулирующей связывание с C1q, E333S, E333A, K326A, K326W-E333S, G237A или G237A-E333S. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и максимального лизиса. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 11 показана селективность активности CDC для вариантов изотипа смешанных антител (IgG1, IgG2, IgG3 и стабилизированный шарниром IgG4) анти-CD52 CAMPATH-1H-E430G-K439E с или без мутации ингибирования связывания с C1q G236R + анти-CD20 11B8-E430G-S440K, с или без мутации, усиливающей связывание с C1q,

E333S. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 12 показана селективность активности CDC при использовании смешанных антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с или без мутации ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A, + анти-CD37 IgG1-CD37-37.3-E430G-S440K с или без мутации E333S, усиливающей связывание с C1q, на (A) клетках Daudi и (B) клетках Wien 133. Клетки-мишени инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-CD37-37.3-E430G (100%).

На Фигуре 13 показана DR5-опосредованная цитотоксичность (A) вариантов отдельного антитела или (B) смеси агонистов антительных вариантов анти-DR5 IgG1-DR5-01-G56T-E430G-K439E с или без мутации ингибирования связывания с C1q G236R + IgG1-DR5-05-E430G-S440K с или без мутации E333S, усиливающей связывание с C1q, на клетках рака поджелудочной железы человека VxPC-3. Проводили трехдневный анализ жизнеспособности, при этом жизнеспособность клеток определяли с использованием набора CellTiter-Glo.

На Фигуре 14 показана активность CDC антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G с мутацией, модулирующей связывание с C1q, G237A, G236R, A327K, K322E или P329R. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12-S440K (0%; не показано) и IgG1-CAMPATH-1H-E430G (100%).

На Фигуре 15 показано связывание антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A (A, B, C), и антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией, усиливающей связывание с C1q, E333S (D, E, F) с FcRn человека. FcRn ELISA выполняли с 5 мкг/мл рекомбинантного внеклеточного домена FcRn человека (FcRnhsECDHis-B2M-BIO), нанесенного в виде покрытия, и серии разведений антител. Количество связанных антител определяли с помощью конъюгированного с HRP козьего

антитела против IgG1 человека и хемилюминесцентного субстрата ABTS. Поглощение измеряли при 405 нм.

На Фигуре 16 показана скорость клиренса 500 мкг внутривенно введенного антитела у мышей SCID. (AC) Общий IgG человека в образцах плазмы определяли с помощью ELISA и наносили на график зависимости концентрации от времени для (A) вариантов IgG1-CAMPATH-1H, (B) вариантов IgG1-11B8 и (C) комбинаций вариантов IgG1-CAMPATH-1H + вариантов IgG1-11B8. Каждая точка данных представляет собой среднее +/- стандартное отклонение трех образцов. (D) Клиренс до 21 дня после введения антитела определяли по формуле $D \cdot 1000 / AUC$ с D, введенной дозой и AUC, площадью под кривой зависимости концентрации от времени.

На Фигуре 17 показано связывание иммобилизованных вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутациями ингибирования связывания с C1q G236R или G237T и вариантов IgG1-11B8-E430G-S440K с мутациями K326A или E333S, усиливающими связывание с C1q, с димерным His-меченным биотинилированным ECD из FcγRIIA аллотипа 131H (A), FcγRIIA аллотипа 131R (B), FcγRIIB (C), FcγRIIA аллотипа 158V (D) и FcγRIIA аллотипа 158F (E), протестированных в анализах ELISA. Связывание представлено для образцов антител с концентрацией 20 мкг/мл относительно контроля без антител (фон) и связывания с IgG1-11B8-E430G-S440K (100%). Детекцию проводили с использованием Стрептавидин-полиHRP и ABTS.

На Фигуре 18 показана селективность активности CDC при использовании смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с или без мутации, ингибирующей связывание с C1q (G236R или G237T) + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией G237A, ингибирующей связывание с FcγR, с или без мутации E333S, усиливающей связывание с C1q. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и как лизис при 40 мкг/мл IgG. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 19 показана избирательная активность комбинаций вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в цельной крови, определенная анализом клеток крови с помощью проточной цитометрии. Оси Y: фракция В-клеток (CD19-положительные/CD3-отрицательные) или фракция Т-клеток (CD19-отрицательные/CD3-положительные) от общей популяции лимфоцитов (CD66b-отрицательные) после инкубации в присутствии эффекторных клеток. Ось X: разные группы обработки. Символы представляют клетки от

пяти разных здоровых доноров, протестированных в двух отдельных инкубациях для каждого донора. (A) Селективная активность IgG1-CAMPATH-1H-G236R-E430G-K439E, смешанного с IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. (B) Селективная активность вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, содержащих дополнительную мутацию G237, в смеси с IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. (C) Селективная активность вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, содержащих дополнительную мутацию G236R или G237, смешанных с IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K, содержащим дополнительную мутацию E333S, усиливающую связывание с C1q. (D) Степень истощения В-клеток различными целевыми антителами для В-клеток по сравнению с взаимозависимыми комбинациями антител IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с дополнительными мутациями G236R, G237Q или G237R, смешанными с IgG1-11B8-G237A -E430G-S440K. Ось Y: представление в логарифмической шкале фракции В-клеток, определенной, как указано выше.

На Фигуре 20 показана селективность активности CDC на разных линиях клеток с разными уровнями экспрессии CD20 и CD52 за счет комбинации антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E и IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией, ингибирующей связывание с C1q в анти-CD52 компоненте и мутацией, усиливающая связывание с C1q в анти-CD20 компоненте. Анализы CDC *in vitro* проводили с 0,01-40 мкг/мл антитела в присутствии 20% NHS с использованием клеточных линий лимфомы Беркитта Daudi (A), Raji (B) и Ramos (C), линии клеток ALL REH (D) и клеточной линии В-клеточной лимфомы U-698-M (E). Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и как максимальный лизис. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 21 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов анти-CD37 IgG1-CD37-37.3-E430G-K439E с или без мутации G236R, ингибирующей связывание с C1q, + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с или без мутации E333S, усиливающей связывание с C1q. (A) Клетки Daudi и (B) клетки WIL2-S инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как нормализованная AUC процентного содержания PI-положительных клеток и как лизис при 40 мкг/мл IgG. Нормализацию проводили для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CD37-37.3-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 22 показано (A) связывание антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H с мутациями E430G или E345R, усиливающими взаимодействие

Fc:Fc, мутацией K439E, ингибирующей самоолигомеризацию, в комбинации с любой из мутаций ингибиторования связывания FcγR и модуляции связывания с C1q, G236R, G237A или G237T, с клеточной линией лимфомы человека Wien 133.

Связывание антител тестировали с помощью проточной цитометрии и представляли нормализованными относительно значения V_{max} IgG1-Campath-1H дикого типа (100%). В качестве отрицательного контроля для связывания использовали несвязывающее анти-gp120 антитело IgG1-b12. (B) Максимальное связывание (V_{max}) с клетками Raji антительных вариантов IgG1-Campath-1H с мутациями E430G и K439E, в комбинации с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, G236R, G237A или G237T, показано нормализованным относительно связывания IgG1-Campath-1H дикого типа (C) Кажущиеся значения K_d антительных вариантов IgG1-Campath-1H с мутациями E430G и S440K в сочетании с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, G236R, G237A или G237T, связывающихся с клетками Raji.

На Фигуре 23 показано связывание антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8 с мутацией E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, мутацией S440K, ингибирующей самоолигомеризацию, в комбинации с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, K326A или E333A (A) или E333S, G237A или G237A-E333S (B) к линии клеток лимфомы человека Raji. Связывание антител тестировали с помощью проточной цитометрии и представляли нормализованными относительно значения V_{max} IgG1-11B8 дикого типа (100%). В качестве отрицательного контроля для связывания использовали несвязывающее анти-gp120 антитело IgG1-b12. (C, D) Максимальное связывание (V_{max}) с клетками Raji антительными вариантами IgG1-11B8 с мутациями E430G и S440K, в сочетании с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, K326A или E333A (C) или E333S, G237A или G237A-E333S (D) показан нормализованным относительно связывания IgG1-11B8 дикого типа (E, F). Кажущиеся значения K_d антительных вариантов IgG1-11B8 с мутациями E430G и S440K в сочетании с любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, K326A или E333A (E) или связывание E333S, G237A или G237A-E333S (F) с клетками Raji.

На Фигуре 24 показано связывание FcRn антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и анти-CD20 IgG1-11B8. (A, C) Связывание с FcRn человека показано для вариантов анти-CD52 антитела IgG1-CAMPATH-1H с мутацией E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, мутацией K439E, ингибирующей самоолигомеризацию, и мутациями, модулирующими связывание с C1q, G237A или G237T, с использованием концентрации антител 40 мкг/мл при (A) pH 6,0 или (C) pH 7,4. (B, D) Связывание с FcRn

человека вариантами анти-CD20-антитела IgG1-11B8 с мутацией E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, мутацией S440K, ингибирующей самоолигомеризацию, и мутациями, модулирующими связывание с C1q, K326A, E333A, G237A или G237A-E333S, с использованием концентрации антител 40 мкг/мл при (B) pH 6,0 или (D) pH 7,4. FcRn ELISA выполняли с 2 мкг/мл покрытого рекомбинантным внеклеточным доменом FcRn человека (FcRnECDHis-B2M-BIO) и серии разведений антител. Количество связанных антител определяли с помощью конъюгированного с HRP козьего антитела против IgG1 человека и хемилюминесцентного субстрата ABTS. Поглощение измеряли при 405 нм.

На Фигуре 25 показаны концентрации общего IgG человека (hIgG), измеренные в образцах крови, взятых у мышей, которым инъецировали антительные варианты анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H или анти-IgG1-11B8 или их смеси. (A) Общая концентрация hIgG в образцах крови, собранных у мышей, которым инъецировали IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q или IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R дикого типа. (B) Общая концентрация hIgG в образцах крови, собранных у мышей, которым вводили IgG1-11B8 дикого типа, IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A или IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S. (C) Общая концентрация hIgG в образцах крови, собранных у мышей, которым инъецировали смеси IgG1-CAMPATH-1H дикого типа + IgG1-11B8 или смеси антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8, несущих мутации, как в (A) и (B). На всех фигурах пунктирная линия представляет прогнозируемую концентрацию IgG1 во времени для антител IgG1 дикого типа у мышей SCID. (D) Клиренс до 21 дня после введения антитела определяли по формуле $D*1000/AUC$ с D, введенной дозой и AUC, площадью под кривой зависимости концентрации от времени.

На Фигуре 26 показана концентрация C4d (в мкг/мл), обнаруженная в образцах, инкубированных с антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-11B8 и IgG1-b12, несущими мутации E430G, K439E или S440K и G236R, G237A, G237Q или G237R, после вычитания средней концентрации C4d, обнаруженной в образцах отрицательного контроля, не содержащих антител. Положительные контрольные образцы включают антительные варианты, несущие мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc E345R, E430G и S440Y (RGY).

На Фигуре 27 показано связывание с C1q с клетками Wien 133, инкубируемыми на льду с нормальной сывороткой человека в качестве источника комплемента, после опсонизации антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-11B8 и IgG1-b12, несущих мутации E430G, K439E или S440K и G236R, G237T, K326A или E333S, детектируемое с помощью проточной цитометрии. Средние значения интенсивности флуоресценции были нормализованы к контрольным реакциям без антител (0%) и

верхнему уровню смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%), оцененного путем подбора логарифмической модели ответа агониста. (A) Связывание C1q контрольных реакций. (B-D) Связывание C1q (B) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E, (C) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E-G236R и (D) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E-G237R, смешанных с несвязывающим контролем IgG1-b12 или различными вариантами IgG1-11B8.

На Фигуре 28 показано связывание FcγR антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H-E430G и IgG1-11B8-E430G, несущих мутацию K439E или S440K, ингибирующую самоолигомеризацию, и мутации, модулирующие связывание с C1q. (A-E) Связывание вариантов иммобилизованных антител с димерными His-мечеными биотинилированными ECD, как было протестировано в анализах ELISA, (A) высокоаффинного аллотипа FcγRIIA 131H, (B) низкоаффинного аллотипа FcγRIIA 131R, (C) FcγRIIB, (D) высокоаффинного аллотипа FcγRIIA 158V или (E) низкоаффинного аллотипа FcγRIIA 158F. (F) Связывание иммобилизованного FcγRIa с вариантами антител, протестированными в ELISA. Связывание представлено для образцов антител с концентрацией 20 мкг/мл и было нормализовано для каждого эксперимента после вычитания сигналов в лунках, инкубированных без первичного антитела, относительно усредненного сигнала, наблюдаемого для IgG1-CAMPATH-1H дикого типа (100%). Детекцию проводили с использованием Стрептавидин-полиHRP и ABTS.

На Фигуре 29 показана селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H, анти-CD20 IgG1-11B8 и анти-CD52 IgG1-h2E8 путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулировать связывание с C1q. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC измерялась в трех независимых экспериментах и представлена как (A) усредненная AUC, нормализованная к несвязывающемуся контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%) и (B) средний процент лизиса, определенный по положительности в анализе с пропидиум йодидом при концентрации антитела 40 мкг/мл.

На Фигуре 30 (A, B) показана эффективность CDC отдельного агента и комбинированных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G, анти-CD20 IgG1-11B8-E430G и неантигенсвязывающих антител IgG1-b12-E430G, несущих собственные мутации, ингибирующие олигомеризацию, и мутации, модулирующие связывание с C1q, как указано. Клетки Wien 133 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как AUC, нормализованная к несвязывающему контрольному

антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 31 показана активация линий репортерных клеток Jurkat, стабильно экспрессирующих либо (А) FcγRIIIa, либо (В) FcγRIIIa, при измерении по уровню люминесценции (RLU) при совместном культивировании с клетками лимфомы Raji и различными концентрациями антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8. Значения люминесценции были нормализованы для каждого эксперимента относительно тех, которые наблюдались для IgG1-b12 (0%) и IgG1-Campath-1H дикого типа + IgG1-11B8 дикого типа (100%), перед усреднением по трем (FcγRIIIa) или двум (FcγRIIIa) экспериментальным повторам.

На Фигуре 32 показана взаимозависимая CDC на клетках Wien 133, индуцированный смесями антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8, несущих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q в неэквиволярных соотношениях. (А) Козависимая CDC, индуцированная смесями, содержащими эквиволярные и неэквиволярные отношения концентраций IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R и IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A. (В) Козависимая CDC, индуцированная смесями, содержащими эквиволярные и неэквиволярные отношения концентраций IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q и IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A.

На Фигуре 33 показана селективность активности CDC с помощью смесей антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H с вариантами анти-HLA-DR IgG1-HLA-DR-huL243 (А) или вариантами анти-HLA-DR IgG1-HLA-DR-1D09C3 (В) путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и ингибируют связывание с C1q. Клетки Oci-Ly17 инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как AUC, нормализованная к несвязывающемуся контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси (А) IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-HLA-DR-huL243-E430G (100%) или (В) IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-HLA-DR-1D09C3-E430G (100%).

На Фигуре 34 показана селективная взаимозависимая активность CDC смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и анти-CD20 IgG1-11B8 путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и ингибируют связывание с C1q. Эффективность CDC показана для вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с любой из мутаций L234A, L234A-L235A, L234F, L234F-L235E, L235A, L235Q, G236R или G237Q и смесей этих вариантов с несвязывающим контрольным антителом IgG1-b12 или IgG1-11B8-E430G-S440K. Эффективность CDC представлена как AUC, нормализованная к несвязывающему контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 35 показана селективная взаимозависимая активность CDC смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и анти-CD20 IgG1-11B8 путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и ингибируют связывание с C1q. (А) Эффективность CDC

антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в виде отдельных агентов или их смесей, несущих мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345K, E345Q, E345R или E345Y, мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, и мутации, ингибирующие связывание с C1q, G236R или G237A. (B) Эффективность CDC антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в виде отдельных агентов или их смесей, несущих мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345Q, E345V или E345Y, мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, и мутации, ингибирующие связывание с C1q, G236R или G237A. (C) Эффективность CDC антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в виде отдельных агентов или их смесей, содержащих соответствующие мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345Q, E345V или E345Y, мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, и мутации, ингибирующие связывание с C1q, G236R или G237A. (D) Эффективность CDC антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 в виде отдельных агентов или их смесей, несущих мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, E430G или K248E-T437R, мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, и мутации, ингибирующие связывание с C1q, G236R, G237A или E333S. Эффективность CDC представлена как AUC, нормализованная к несвязывающему контрольному антителу IgG1-b12 (0%) и смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 36 показан взаимозависимая CDC на клетках лимфомы Raji, индуцированный смесями антительных вариантов IgG1-CD37-37-3 и IgG1-11B8, несущих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q. (A) Относительные площади под кривой (AUC), нормализованные к минимальному лизису (0% с IgG1-b12) и максимальному лизису (100% со смесью IgG1-CD37-37-3-E430G + IgG1-11B8 -E430G) лизиса клеток, индуцированного указанными антительными вариантами в разведении или их смесями. (B) Максимальный процент лизиса, индуцированного указанными антительными вариантами и их смесями.

На Фигуре 37 показана селективная взаимозависимая активность CDC смешанных антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и анти-CD20 IgG1-11B8 путем введения мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q. Образцы CLL пациентов инкубировали с сериями концентраций антител в присутствии 20% NHS. Эффективность CDC представлена как процент жизнеспособных В-клеток при инкубации с вариантами

антител. Показаны результаты с использованием образцов CLL от пациентов 1 (А), 2 (В) и 3 (С).

На Фигуре 38 показана фракция В-клеток, CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток, обнаруженная с помощью проточной цитометрии после инкубации образцов цельной крови со смесями антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-huCLB-T3/4 и IgG1-CD5-INSERM, несущих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q. Процент (А) В-клеток, (В) CD4+ Т-клеток и (С) CD8+ Т-клеток, обнаруженных в образцах цельной крови 4 доноров после инкубации с указанными антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-huCLB-T3/4 и IgG1-b12. Процент (D) В-клеток, (E) CD4+ Т-клеток и (F) CD8+ Т-клеток, обнаруженных в образцах цельной крови 4 доноров после инкубации с указанными антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-CD5-INSERM и IgG1-b12. Фракции рассчитывали как $[100\% \times (\text{количество клеток в образце} / \text{количество клеток в «образце без антител»}) \times (\text{количество гранулоцитов в «образце без антител»} / \text{количество гранулоцитов в образце})]$.

На Фигуре 39 показана совместная активация запрограммированной гибели раковых клеток с помощью антительных вариантов против DR4 и DR5, содержащих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и ингибируют (G237T) или усиливают (K326W-E333S) связывание с C1q. (А) Жизнеспособность клеток рака поджелудочной железы человека ВхРС-3 после 72-часовой инкубации с указанными вариантами антител. (В) Жизнеспособность клеток рака толстой кишки человека COLO 205 после 72-часовой инкубации с указанными вариантами антител. Процент жизнеспособных клеток рассчитывали по следующей формуле: $\% \text{ жизнеспособных клеток} = [(\text{люминесценция образца антитела} - \text{люминесценция образца стауроспорина}) / (\text{люминесценция образца без антител} - \text{люминесценция образца стауроспорина})] * 100.$ А-В).

Смесь анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K (отсутствие активности CDC у отдельного агента) + анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E (частичная активность CDC у отдельного агента) полностью восстанавливала максимальную активность CDC на Wien 133, аналогично до уровня смеси, нацеленной на CD20 и CD52, IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (аналогичная доза-реакция на Фигуре 1А; 100% на Фигуре 1В). Добавление анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K (отсутствие активности CDC у отдельного агента) к анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-P329R-E430G-K439E (отсутствие активности CDC у отдельного агента), частично восстановило лизис клеток на Wien 133 (56 % при насыщении целевого связывания на Фигуре 1А; 28% на

Фигуре 1B).

Добавление анти-CD20 IgG1-11B8-P329R-E430G-S440K (отсутствие активности CDC у отдельного агента) к анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E (частичная активность CDC у отдельного агента), частично восстановило активность CDC на Wien 133 до уровня ниже, чем у смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (более высокая EC50 и более низкая максимальная гибель на Фигуре 1A; 47% на Фигуре 1B), но умеренно выше, чем у смеси анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + контрольное антитело (IgG1-b12), которое имеет аналогичное максимальное уничтожение, но более высокое значение EC50 (Фигура 1A) и более низкую относительную AUC (36% на Фигуре 1B). Напротив, добавление анти-CD20 IgG1-11B8-P329R-E430G-S440K (отсутствие активности CDC у отдельного агента) к анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-P329R-E430G-K439E (отсутствие активности CDC у отдельного агента) не восстанавливало какой-либо активности CDC (Фигура 1A-B).

Эти данные показывают, что введение мутации P329R, которая ингибирует прямое связывание с C1q, может дополнительно подавить активность CDC индивидуальных компонентов в смесях антител K439E + S440K с усиленными взаимодействиями Fc-Fc (E430G). Неожиданно было обнаружено, что для двух антител против двух разных мишеней, которые оба не проявляли детектируемой активности CDC в виде отдельных агентов, активность CDC могла быть частично восстановлена для смесей, в которых только одно из двух антител содержало мутацию ингибирования связывания C1q, P329R. Эти данные показывают, что смесь анти-CD20 IgG-E430G-S440K + анти-CD52 IgG-E430G-K439E антител может быть применена для создания селективности активности CDC на клетках, одновременно экспрессирующих две разные мишени, путем введения мутации ингибирования связывания с C1q. P329R для уменьшения или подавления активности в виде отдельного агента. Не ограничиваясь какой-либо теорией, считаем, что avidность C1q для сайтов связывания с C1q в трех антителах в гетерогексамерных сборках IgG может быть достаточно высокой для восстановления частичной активности CDC. Напротив, потеря всех шести сайтов связывания с C1q во всех шести антителах, например, в смесях двух антител, оба из которых содержат мутацию P329R, приводит к потере активности CDC.

Пример 3: Селективность активности CDC с помощью смешанных антительных вариантов путем введения мутации K322E в анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-K439E + анти-CD20 IgG1-11B8-S440K с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc E430G

Влияние мутации K322E на эффективность CDC *in vitro* тестировали с

использованием смесей вариантов анти-CD20 антитела IgG1-11B8 и анти-CD52 антитела IgG1-CAMPATH-1H. Различные концентрации очищенных антител (диапазон конечных концентраций 0,001-30,0 мкг/мл) были протестированы в анализе CDC *in vitro* на клетках Wien 133 с 20% NHS, по существу, как описано в Примере 2. Различные мутации были введены в антитела IgG1-11B8 и IgG1-CAMPATH-1H: E430G, которые индуцируют усиленные взаимодействия Fc-Fc; K322E, который ингибирует прямое связывание с C1q с антителами; и любая из мутаций K439E или S440K, которые ингибируют образование гомогексамерных комплексов антител посредством ингибирования межмолекулярных взаимодействий Fc-Fc и способствуют образованию комплексов гетерогексамерных антител посредством кросс-комплементарных взаимодействий Fc-Fc. Процент лизиса рассчитывали по количеству PI-положительных клеток. Данные анализировали с использованием наиболее подходящих значений нелинейной подгонки дозозависимого эффекта с использованием логарифмически преобразованных концентраций и рассчитывали площадь под кривыми доза-ответ трех экспериментальных повторов. Значения относительных площадей под кривой (AUC) представляют собой нормализацию к минимальному лизису (0% с IgG1-b12) и максимальному лизису (100% со смесью IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G).

Смесь 1: 1 анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G + анти-CD20 IgG1-11B8-E430G индуцировала эффективный лизис клеток Wien 133 клеток (Ошибка! Источник ссылки не найден.А; установлено значение 100% в Error! Источник ссылки не найден.В). Когда IgG1-CAMPATH-1H-E430G был протестирован в виде отдельных агентов, введение мутации K439E привело к снижению эффективности CDC, а K439E-K322E (SEQ ID NO 91) привело к полной потере активности CDC (Ошибка! Источник ссылки не найден. А-В). Для IgG1-11B8-E430G введение либо мутации S440K, либо S440K-K322E (SEQ ID NO 109) привело к потере эффективности CDC (Ошибка! Источник ссылки не найден. А-В).**Ошибка! Источник ссылки не найден.Ошибка! Источник ссылки не найден.Ошибка! Источник ссылки не найден.Ошибка! Источник ссылки не найден.**

Смесь анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K (отсутствие активности CDC у отдельного агента) + анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E (частичная активность CDC у отдельного агента) восстанавливала высокую активность CDC на клетках Wien 133, сравнимую с уровнем смеси, нацеленной на CD20 и CD52, IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (сопоставимая доза-реакция на Фигуре 2А; 87% на Фигуре 2В). Добавление анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K (отсутствие активности CDC у отдельного агента) к анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-P329R-E430G-K439E (отсутствие активности CDC у отдельного агента), частично восстановило лизис

клеток на Wien 133 (56 % при насыщении целевого связывания на Фигуре 1А; 28% на Фигуре 1В).

Добавление анти-CD20 IgG1-11B8-K322E-E430G-S440K (отсутствие активности CDC у отдельного агента) к анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E (частичная активность CDC у отдельного агента), частично восстановило активность CDC на Wien 133 (выше EC50, чем смесь IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G на Фигуре 2А; 66% на Фигуре 2В). Напротив, добавление анти-CD20 IgG1-11B8-K322E-E430G-S440K (отсутствие активности CDC у отдельного агента) к анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-K322E-E430G-K439E (отсутствие активности CDC у отдельного агента) восстанавливает только минимальную активность CDC (высокий EC50 и максимальное уничтожение приблизительно 31% на Фигуре 2А; 10% на Фигуре 2В).

Эти данные иллюстрируют, что введение мутации K322E, которая ингибирует прямое связывание с C1q, может дополнительно подавлять активность CDC индивидуальных компонентов в смесях антител K439E + S440K с усиленными взаимодействиями Fc-Fc (E430G). Неожиданно было обнаружено, что для двух антител против двух разных мишеней, которые оба не проявляли детектируемой активности CDC в виде отдельных агентов, активность CDC могла быть восстановлена до почти максимального лизиса клеток для смесей, в которых только одно из двух антител содержало мутацию K322E, ингибирующую связывания с C1q. Эти данные показывают, что смесь анти-CD20 IgG-E430G-S440K + анти-CD52 IgG-E430G-K439E антител может быть применена для создания селективности активности CDC на клетках, одновременно экспрессирующих две разные мишени, путем введения мутации ингибирования связывания с C1q, K322E, для уменьшения или подавления активности в виде отдельного агента.

Пример 4: Селективность активности CDC на разных линиях клеток с помощью смешанных антительных вариантов путем введения мутации K322E в анти-CD20 антитела + анти-CD52 с мутацией E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc

В Примере 2 и Примере 3 описывается, что конкретные комбинации антител к CD20 и CD52 с усиленным взаимодействием Fc-Fc проявляют наиболее эффективную активность CDC в отношении клеток Wien 133, если оба компонента присутствуют одновременно, при условии, что каждое из антител содержит либо мутацию K439E, либо S440K, которая блокирует гомоолигомеризацию посредством взаимодействий Fc-Fc. Селективная активность смеси по сравнению с ее отдельными компонентами была улучшена путем введения мутации ингибирования связывания с C1q P329R (пример 2)

или K322E (пример 3) в анти-CD52 антитело IgG1-CAMPATH-1H-E430G-S440K для супрессии его остаточной активности CDC в качестве отдельного компонента. Здесь селективность активности CDC с помощью смесей антительных вариантов IgG1-11B8-E430G-S440K + анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией K322E для клеток, экспрессирующих достаточные уровни как CD20, так и CD52 на поверхности клеток тестировали на семи различных линиях клеток человека: клеточные линии лимфомы Беркитта Wien 133, Daudi (ATCC, кат. № CCL-213), Raji (ATCC, кат. № CCL-86) и Ramos (ATCC, кат. № CRL-1596), клеточной линии острой лимфобластной лимфомы (ALL) REH (DSMZ, кат. № ACC-22), линии миеломных клеток U266B1 (ATCC, кат. № TIB-196) и клеточной линии В-клеточной лимфомы U-698-M (DSMZ, кат. № ACC-4). Анализы CDC *in vitro* проводили с 20% NHS и конечными концентрациями антител 30,0 мкг/мл, по существу, как описано в Примере 2. Лизис клеток рассчитывали из числа PI-положительных клеток, усредненного из трех экспериментальных повторов и нормализованного к клеточной линии относительно лизиса клеток, измеренного для антитела отрицательного контроля IgG1-b12 (0%) и для IgG1-CAMPATH-1H-E430G (100%, для REH, U266B1 и Wien 133) или IgG1-11B8-E430G (100%, для Daudi, Raji, Ramos и U-698-M), в зависимости от того, какое антитело индуцировало самый высокий лизис.

Уровни экспрессии CD52 и CD20 на клеточной поверхности определяли методом непрямой иммунофлуоресценции с использованием набора Human IgG Calibrator Kit (Bioscytex, кат. CP010). Клетки (3×10^4 клеток/лунку) инкубировали в полистирольных 96-луночных круглодонных планшетах (Greiner bio-one, кат. № 650101). Следующие стадии выполняли при 4°C. Клетки осаждали центрифугированием в течение 3 минут при $300 \times g$ и ресуспендировали в 50 мкл PBS (B Braun, кат. № 3623140), содержащем насыщающие концентрации 10 мкг/мл IgG1-CAMPATH-1H (анти-CD52) или IgG1-11B8 (анти-CD20). После 30-минутной инкубации при 4°C клетки осаждали центрифугированием при $300 \times g$ в течение 3 минут и ресуспендировали в 150 мкл FACS-буфера (PBS + 0,1% (масс./об.) бычьего сывороточного альбумина (BSA) + 0,02% (масс./об.) азида натрия). Установочные и калибровочные гранулы добавляли в планшет в соответствии с инструкциями производителя. Клетки и гранулы параллельно промывали еще два раза 150 мкл буфера FACS, ресуспендировали в 50 мкл FITC-конъюгированного мышинового IgG, абсорбированного козьим антителом против IgG человека (BioCytex), и инкубировали в течение 30 минут при 4°C. Клетки и гранулы дважды промывали и ресуспендировали в 150 мкл буфера FACS. Клетки ресуспендировали в Fixative (BioCytex) и инкубировали от 5 до 60 минут при 4°C в защищенном от света месте. Иммунофлуоресценцию измеряли проточной цитометрией на FACS Canto II (BD Biosciences), регистрируя 10 000 событий в

популяции жизнеспособных клеток. Среднее геометрическое значение интенсивности флуоресценции калибровочных шариков использовали для расчета калибровочной кривой, которая была вынуждена пройти через нулевую интенсивность и нулевую концентрацию с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Для каждой клеточной линии способности связывания антител (ABC) IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8, представляющие экспрессию на поверхности клеток CD52 и CD20, соответственно, были рассчитаны с использованием средней геометрической интенсивности флуоресценции на основе уравнения калибровочной кривой (интерполяция неизвестных значений стандартной кривой) с использованием программного обеспечения GraphPad с последующим вычитанием фона, определенного для лунок, инкубированных без первичных антител. Значения ABC были усреднены из двух независимых экспериментов и (сведены в Таблицу 2).

На Фигуре 3 показано, что активность CDC при целевом насыщении IgG1-CAMPATH-1H-E430G и IgG1-11B8-E430G варьировала в зависимости от целевых уровней экспрессии: U266B1 (CD20 ABC <20 000; CD52 ABC > 1×10^6) и REN (CD20 ABC <20 000; CD52 ABC > 100000) клетки были устойчивы к лизису анти-CD20-антителом IgG1-11B8-E430G, но чувствительны к анти-CD52-антителу IgG1-CAMPATH-1H-E430G. Напротив, клетки Daudi (CD52 ABC <75000; CD20 ABC > 100000) были устойчивы к IgG1-CAMPATH-1H-E430G, но чувствительны к IgG1-11B8-E430G. Остальные четыре протестированные клеточные линии были чувствительны как к IgG1-CAMPATH-1H-E430G, так и к IgG1-11B8-E430G: Wien 133 (CD20 ABC > 100000; CD52 ABC > 300000), Raji (CD20 ABC > 100000; CD52 ABC > 85000), U-698-M (CD20 ABC > 70000; CD52: ABC > 90000) и Ramos (CD20 ABC > 80000; CD52 ABC > 175000).

Для IgG1-CAMPATH-1H-E430G введение мутации K439E привело к снижению активности CDC отдельного агента в клетках U-698-M и Raji (CD52 ABC <100000), но не оказало значительного влияния на клеточные линии U266B1 (CD52 ABC > 1×10^6), клетки Wien 133 (CD52 ABC > 300000), клетки Ramos (CD52 ABC > 175000) и клетки REN (CD52 ABC > 135000). Ингибирование связывания с C1q путем введения K322E в IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E дополнительно устраняет активность CDC отдельного агента на всех тестируемых клеточных линиях, которые реагируют на IgG1-CAMPATH-1H-E430G. Для IgG1-11B8-E430G введение только мутации S440K или введение мутаций S440K и K322E привело к полному ингибированию активности CDC отдельного агента на всех тестируемых клеточных линиях, которые были чувствительны к IgG1-11B8-E430G: Daudi (CD20 ABC <115,000), Wien 133 (CD20 ABC <110,000), Raji (CD20 ABC <120,000), U-698-M (CD20 ABC <75,000) и Ramos (CD20 ABC <85,000).

Смесь IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + IgG1-11B8-E430G-S440K показала активность CDC на всех тестируемых клеточных линиях, независимо от уровней поверхностной экспрессии CD20 и CD52 (Фигура 3). Напротив, смесь IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-K322E + IgG1-11B8-E430G-S440K показала избирательный лизис только тех клеточных линий, которые демонстрировали достаточные уровни поверхностной экспрессии как CD20, так и CD52: Wien 133 (CD20 ABC > 100000; CD52 ABC > 300000), Ramos (CD20 ABC > 80000; CD52 ABC > 175000), U-698-M (CD20 ABC > 70000; CD52 ABC > 90000) и Raji (CD20 ABC > 100000; CD52 ABC > 85000).

Когда CD20 или CD52 экспрессировались только на очень низких уровнях, не наблюдалось активности CDC со смесью IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-K322E + IgG1-11B8-E430G-S440K: Daudi (CD52 ABC < 75000), U266B1 U266B1 (CD20 ABC < 20 000) и REH (CD20 ABC < 20 000). Когда мутация K322E ингибирования связывания C1q была введена в оба антитела (IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-K322E + IgG1-11B8-E430G-S440K-K322E), активности CDC не наблюдалось. Вместе эти данные предполагают, что привлечение C1q и эффективность CDC с помощью IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-K322E зависит от его гетероолигомеризации с IgG1-11B8-E430G-S440K.

В заключение, селективное уничтожение клеток, экспрессирующих достаточные уровни как CD20, так и CD52, может быть достигнуто с использованием смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-K322E + IgG1-11B8-E430G-S440K; напротив, эта смесь демонстрировала фоновые уровни лизиса на клеточных линиях, которые экспрессировали такие низкие уровни экспрессии CD20 или CD52, что они не могли быть уничтожены активностью CDC отдельного агента IgG1-11B8-E430G-S440K и IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-K322E, соответственно.

Таблица 2: Экспрессия CD52 и CD20 на клеточной поверхности в клеточных линиях гемобластозов.

Мишень	ABC ¹						
	U266B1	Wien 133	Ramos	REH	U-698-M	Raji	Daudi
CD52 IgG1-CAMPATH-1H	1,455,918	332,343	178,794	135,088	93,651	85,514	7,275
CD20 IgG1-11B8	18,544	101,937	81,198	13,031	70,047	115,310	110,004

¹Экспрессия на поверхности клеток выражается как количество специфических связывающих способностей антител (ABC) на клетку, определенное с помощью набора Human IgG Calibrator Kit (Biotex).

Пример 5: Анализ влияния различных мутаций ингибирования связывания с C1q в антителе анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E на селективную активность CDC смесей антител с антителом против CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K

Выше было описано введение P329R (Ошибка! Источник ссылки не найден.) или K322E (Ошибка! Источник ссылки не найден.), мутаций ингибирования связывания с C1q, которые приводили к ингибированию остаточной активности CDC IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E в клетках Wien 133, в то время как активность CDC полностью, частично или совсем не восстанавливалась при смешивании с IgG1-11B8-E430G-S440K, в зависимости от тестируемой клеточной линии (Ошибка! Источник ссылки не найден.). Здесь эффекты различных мутаций ингибирования связывания с C1q сравнивали в анализах CDC *in vitro* с использованием клеток Wien 133 с вариантами IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, содержащими G236R (SEQ ID NO 84), K322A (SEQ ID NO 90), E269K (SEQ ID NO 81), K322E или P329R, мутациями ингибирования связывания с C1q (указанные в данном документе как ожидаемое снижение аффинности связывания с C1q) в смеси с IgG1-11B8-E430G-S440K. Анализ CDC *in vitro* с использованием клеток Wien 33 проводили с 20% NHS и концентрациями антител в серийных разведениях (диапазон конечных концентраций 0,002-40,0 мкг/мл в 4-кратных разведениях), по существу, как описано в разделе Ошибка! Источник ссылки не найден.. Лизис клеток рассчитывали по количеству PI-положительных клеток, измеренному с помощью проточной цитометрии на сортировщике Intellicyt iQue™, усредненных по трем экспериментальным повторам. Значения относительных площадей под кривой (AUC) представляют собой нормализацию к минимальному лизису (0% с отрицательным контролем IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K) и максимальному лизису (100% со смесью IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G). Ошибка! Источник ссылки не найден. демонстрируют гистограммы значений AUC кривых активности CDC «доза-ответ» на клетках Wien 133. Введение любой из мутаций ингибирования связывания с C1q (G236R, K322A, E269K, K322E или P329R) приводило к полному ингибированию остаточной активности CDC отдельного агента с помощью IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E на Wien 133. В смеси с IgG1-11B8-E430G-S440K увеличивающиеся уровни восстановления активности CDC наблюдались с вариантами IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, содержащими единственную мутацию ингибирования связывания с C1q, P329R, K322E, E269K, K322A или G236R. Эти данные указывают на то, что существует прямая корреляция между аффинностью вариантов связывания с C1q IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E (P329R, K322E, E269K, K322A или G236R) и восстановлением активности CDC для смесей с IgG1-11B8-E430G-S440K. Ошибка! Источник ссылки не найден. Ошибка! Источник ссылки не

найден.Ошибка! Источник ссылки не найден.Ошибка! Источник ссылки не найден.Ошибка! Источник ссылки не найден.

Пример 6: Анализ влияния различных мутаций, усиливающих связывание с C1q, в анти-CD20-антителе IgG1-11B8-E430G-S440K на селективную активность CDC смесей антител с анти-CD52-антителом IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E

Эффекты различных мутаций, усиливающих связывание с C1q, сравнивали в анализах CDC *in vitro* с использованием клеток Wien 133 с вариантами IgG1-11B8-E430G-S440K, содержащими мутации, усиливающие связывание с C1q E333S (SEQ ID NO 103), K326W (SEQ ID NO 112) или K326A/E333A (SEQ ID NO 111; указаны в данном документе как ожидаемое повышение аффинности связывания с C1q) в смеси с IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E. Анализ CDC *in vitro* с использованием клеток Wien 133 проводили с 20% NHS и концентрациями антител в серийных разведениях (диапазон конечных концентраций 0,002-40,0 мкг/мл в 4-кратных разведениях), по существу, как описано в разделе **Ошибка! Источник ссылки не найден.** Лизис клеток рассчитывали по количеству PI-положительных клеток, измеренному с помощью проточной цитометрии на сортировщике Intellicyt iQue™, усредненных по трем экспериментальным повторам. Значения относительных площадей под кривой (AUC) представляют собой нормализацию к минимальному лизису (0% с отрицательным контролем IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K) и максимальному лизису (100% со смесью IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G). **Error! Источник ссылки не найден.** демонстрируют гистограммы значений AUC кривых активности CDC «доза-ответ» на клетках Wien 133. Введение мутаций, усиливающих связывание с C1q, E333S, K326W или K326A/E333A, привело к увеличению активности CDC отдельного агента IgG1-11B8-E430G-S440K на Wien 133 (7% для E333S; 18% для K326W; 25% для K326A/E333A по сравнению с 1% без мутации, усиливающей связывание с C1q). В смеси с IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E увеличивающиеся уровни активности CDC наблюдались с вариантами IgG1-11B8-E430G-S440K, содержащими мутации, усиливающими связывание с C1q, K326A/E333A, K326W или E333S. Эти данные указывают на то, что существует прямая корреляция между аффинностью связывания с C1q вариантов IgG1-11B8-E430G-S440K (K326A/E333A, K326W или E333S) и активностью CDC для смесей с IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E. **Ошибка! Источник ссылки не найден.Ошибка! Источник ссылки не найден.**

Пример 7: Анализ влияния различных мутаций ингибирования связывания с C1q в антителе анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E и мутаций, усиливающих связывание с C1q в антителе анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K, на селективную активность CDC смеси анти-CD52 и анти-CD20 антительных

вариантов

Эффекты различных мутаций, которые влияют на аффинность связывания с C1q, сравнивали в анализах CDC *in vitro* с использованием клеток Wien 133 с вариантом IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, содержащим мутацию ингибирования связывания с C1q, G236R, K322A, E269K, K322E или P329R (описанный в Примере 5) в смесях с вариантом IgG1-11B8-E430G-S440K, содержащим мутации, усиливающие связывание с C1q, E333S, K326W или K326A/E333A (описанные в Примере 6). Анализ CDC *in vitro* с использованием клеток Wien 133 проводили с 20% NHS и концентрациями антител в серийных разведениях (диапазон конечных концентраций 0,002-40,0 мкг/мл в 4-кратных разведениях), по существу, как описано в Примере 2. Лизис клеток рассчитывали по количеству PI-положительных клеток, измеренному с помощью проточной цитометрии на сортировщике Intellicyt iQue™, усредненных по трем экспериментальным повторам. Значения относительных площадей под кривой (AUC) представляют собой нормализацию к минимальному лизису (0% с отрицательным контролем IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K) и максимальному лизису (100% со смесью IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G). На Фигуре 6 показаны гистограммы значений AUC кривых активности CDC «доза-ответ» на клетках Wien 133. Смеси анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K с мутацией, усиливающей связывание с C1q, в смеси с антительными вариантами анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутациями G236R или K322A, ингибирующими связывание с C1q, показали улучшенное восстановление активности CDC на клетках Wien 133 по сравнению со смесями с IgG1-11B8-E430G-S440K без мутации, усиливающей связывание с C1q. Обнаружена корреляция между ожидаемой силой аффинности связывания с C1q в варианте IgG1-11B8-E430G-S440K (K326A/E333A > K326W > E333S) и уровнем восстановления активности CDC при смешивании с вариантом IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, содержащим мутацию ингибирования связывания с C1q, со слегка увеличенным максимальным восстановлением лизиса для G236R (Фигура 6А; таблица 3), максимальным восстановлением лизиса с повышенными значениями EC50 для K322A (Фигура 6В; таблица 3), E269K (Фигура 6С; таблица 3), K322E (Фигура 6D; таблица 3) или максимальный лизис оставался сниженным с повышенными значениями EC50 для P329R (Фигура 6Е; таблица 3).

Таблица 3

IgG1-CAMPATH-1H----IgG1-11B8-----IgG1-b12-----	Среднее	Станд. откл.	n=
E430G-----E430G-----	96,7	0,14	2
-----K439E+S440K--	4,81	0,56	3
-----E430G-S440K-----K439E-----	6,01	1,13	3
-----E430G-S440K-K326W-----K439E-----	44,1	2,42	3

-----E430G-S440K-E333S-----K439E-----	23,3	2,50	3
-----E430G-S440K-K326A-E333A--K439E-----	59,5	1,50	3
E430G-K439E-K322E-----S440K-----	7,03	0,71	3
E430G-K439E-K322E--E430G-S440K-----	89,3	1,22	3
E430G-K439E-K322E--E430G-S440K-K326W-----	95,9	0,81	
E430G-K439E-K322E--E430G-S440K-E333S-----	95,4	0,92	
E430G-K439E-K322E--E430G-S440K-K326A-E333A-----	96,6	1,05	
<hr/>			
E430G-----E430G-----	95,9	0,92	
E430G-K439E-P329R-----S440K-----	5,47	1,83	
E430G-K439E-P329R--E430G-S440K-----	27,5	13,6	
E430G-K439E-P329R--E430G-S440K-K326W-----	77,2	5,80	
E430G-K439E-P329R--E430G-S440K-E333S-----	75,0	5,61	
E430G-K439E-P329R--E430G-S440K-K326A-E333A-----	86,6	2,87	
E430G-K439E-K322A-----S440K-----	5,95	1,38	
E430G-K439E-K322A--E430G-S440K-----	90,4	1,07	
E430G-K439E-K322A--E430G-S440K-K326W-----	95,5	1,32	
E430G-K439E-K322A--E430G-S440K-E333S-----	95,8	1,16	
E430G-K439E-K322A--E430G-S440K-K326A-E333A-----	96,4	1,46	
<hr/>			
E430G-----E430G-----	95,1	0,28	
E430G-K439E-G236R-----S440K-----	5,52	1,42	
E430G-K439E-G236R--E430G-S440K-----	91,4	1,93	3
E430G-K439E-G236R--E430G-S440K-K326W-----	95,6	1,12	
E430G-K439E-G236R--E430G-S440K-E333S-----	95,3	1,00	
E430G-K439E-G236R--E430G-S440K-K326A-E333A-----	96,4	0,95	
E430G-K439E-E269K-----S440K-----	4,93	1,44	
E430G-K439E-E269K--E430G-S440K-----	89,3	1,00	
E430G-K439E-E269K--E430G-S440K-K326W-----	95,6	1,45	
E430G-K439E-E269K--E430G-S440K-E333S-----	95,0	1,19	
E430G-K439E-E269K--E430G-S440K-K326A-E333A-----	95,7	1,35	
<hr/>			
E430G-----E430G-----	96,2	0,92	2
E430G-----	90,9	0,42	
E430G-K439E-----	75,1	1,98	
E430G-K439E-----S440K-----	69,9	1,06	
E430G-K439E-----E430G-S440K-----	93,7	1,06	
E430G-K439E-----E430G-S440K-K326W-----	96,4	0,78	
E430G-K439E-----E430G-S440K-E333S-----	96,3	0,92	
E430G-K439E-----E430G-S440K-K326A-E333A-----	96,3	0,85	
-----E430G-----	76,8	2,95	

Пример 8: Целевое связывание антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8 на клетках

Связывание с клетками лимфомы Wien 133 и Raji было проанализировано с помощью проточной цитометрии для анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H с мутациями, ингибирующими связывание с C1q, E430G, K439E и G236R или K322A, и анти-CD20 IgG1-11B8 с E430G, S440K и мутацией E333S, усиливающей связывание с C1q. Суспензии клеток промывали буфером для FACS и ресуспендировали в буфере для FACS [PBS +

0,1% (масс./об.) бычьего сывороточного альбумина (BSA) + 0,02% (масс./об.) азида натрия] в концентрации $2,5 \times 10^6$ клеток/мл. Образцы клеточной суспензии по 40 мкл (100000 клеток на лунку) высевали в полистирольные 96-луночные круглодонные планшеты (Greiner Bio-One; кат. № 650101) и инкубировали с образцами 40 мкл антител (конечные концентрации 0,001 - 30 мкг/мл в 3-кратных разведениях) в течение 30 минут при 4°C. Клетки осаждали центрифугированием при 300x g в течение 3 минут при 4°C и дважды промывали 150 мкл буфера FACS. Клетки инкубировали с 50 мкл вторичного антитела, конъюгированного с R-фикоэритрином (R-PE), козьего антитела против IgG F(ab')₂ человека (Jackson ImmunoResearch, кат. № 109-116-098, 1: 100) в течение 30 минут при 4°C, в защищенном от света месте. Клетки дважды промывали 150 мкл буфера FACS, ресуспендировали в 150 мкл буфера FACS и связывание антител анализировали с помощью проточной цитометрии на сортировщике Intellicyt iQue. Кривые связывания анализировали с использованием нелинейного регрессионного анализа (сигмоидальная доза-реакция с переменным наклоном) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

На Фигуре 7 показано, что для IgG1-CAMPATH-1H все протестированные антительные варианты показали аналогичное дозозависимое связывание как с клетками Wien 133 (Фигура 7A), так и с клетками Raji (Фигура 7B). Эти данные показывают, что введение одиночных мутаций E430G и K439E, а также двойной мутации E430G-K439E не оказало влияния на связывание мишени на поверхности клетки. Также введение дополнительной мутации G236R или K322A не влияло на связывание мишени CD52 на поверхности клетки.

На Фигуре 7 показано, что для IgG1-11B8 все протестированные антительные варианты показали аналогичное дозозависимое связывание как с клетками Wien 133 (Фигура 7C), так и с клетками Raji (Фигура 7D). Эти данные показывают, что введение одиночных мутаций E430G и S440K, а также двойной мутации E430G-S440K не влияло на связывание мишени на поверхности клетки. Также введение дополнительной мутации G236R или K322A не влияло на связывание мишени CD52 на поверхности клетки.

Пример 9: Анализ влияния мутаций ингибирования связывания с C1q в антителе анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E и мутации, усиливающей связывание с C1q в антителе анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K, на функции FcγR-опосредованного эффектора с использованием смесей анти-CD52 и анти-CD20 антительных вариантов

Эффекты введения мутаций, ингибирующих связывание с C1q G236R или K322A в вариантах IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, и мутации E333S, усиливающей

связывание с C1q в IgG1-11B-E430G-S440K, на антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) были протестировано в репортерном биоанализе ADCC на клетках Raji и в анализе ADCC in vitro Europium TDA (EuTDA) с моноклеарными клетками периферической крови человека (PBMC) на клетках Wien 133.

Для репортерного биотеста ADCC варианты IgG1-CAMPATH-1H (WT, E430G, K439E (SEQ ID NO 29), E430G-K439E, E430G-K439E-G236R и E430G-K439E-K322A) и IgG1-11B430G (WT, E430G, S440K (SEQ ID NO 30), E430G-S440K, E430G-S440K-E333S) тестировали с использованием системы анализа люциферазы Bio-Glo (Promega, кат. G7940) на клетках Raji. В качестве эффекторных клеток набор содержит Т-клетки человека Jurkat, которые сконструированы для стабильной экспрессии высокоаффинного FcγRIIIa (V158) и ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT) - ответного элемента, управляющего экспрессией люциферазы светлячка. Вкратце, клетки Raji (5000 клеток/лунку) высевали в 384-луночные белые планшеты OptiPlates (Perkin Elmer кат. № 6007290) в буфере для анализа ADCC [среда RPMI-1640 (Lonza, кат. № BE12-115F) с добавлением 4% сыворотки с низким уровнем IgG (Promega, кат. G711A)] и инкубировали в течение 6 часов при 37°C/5% CO₂ в общем объеме 30 μл, содержащих серии концентраций антител (конечные концентрации 0,4–10 000 нг/мл в 3,5-кратных разведениях) и размороженные клетки ADCC Bioassay Effector (Promega, кат. № G701A). После инкубации планшетов в течение 15 минут при комнатной температуре (RT), 30 μл люциферазного реагента Bio-Glo Assay [субстрат для анализа люциферазы Bio-Glo (Promega кат. № G720A) в буфере для анализа люциферазы Bio-Glo (Promega, кат. № G719A)] и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Выработку люциферазы количественно определяли считыванием люминесценции на считывающем устройстве EnVision Multilabel Reader (Perkin Elmer).

Введение мутации G236R, ингибирующей связывание с C1q, в IgG1-CAMPATH-E430G-K439E приводило к полному ингибированию активации FcγRIIIa в эффекторных клетках после связывания одного анти-CD52-антитела на клетках Raji, тогда как мутация K322A, ингибирующая связывание с C1q, приводила к частичному ингибированию активации FcγRIIIa в репортерном биоанализе ADCC (Фигура 8A). Все протестированные антительные варианты IgG1-11B8 показали значительную активацию FcγRIIIa в эффекторных клетках после связывания единичных анти-CD20-антител на клетках Raji без значительных различий между вариантами IgG1-11B8, содержащими мутации S440K и/или E430G и/или E333S. (Фигура 8B).

Тест in vitro EuTDA ADCC (DELFIА EuTDA Cytotoxicity Assay, Perkin Elmer, кат. № AD0116) выполняли на клетках Wien 133 со свежесыведенными PBMC от трех

различных здоровых доноров в качестве эффекторных клеток для проверки активности ADCC антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H (WT, K439E, E430G-K439E, G236R-E430G-K439E и K322A-E430G-K439E) и антительные варианты IgG1-11B8 (WT, S440K, E430G-S440K и E333S-E430G-S440K) как отдельные агенты или в комбинациях (IgG1-CAMPATH-1H-G236R-E430G-K439E или -K322A-E430G-K439E с IgG1-11B8-E333S-E430G-S440K). PBMC выделяли из лейкоцитов (Sanquin, Амстердам, Нидерланды) с использованием среды для разделения лимфоцитов (Lonza, кат. № 17-829E) для центрифугирования стандартной плотности фиколла в соответствии с инструкциями производителя. После ресуспендирования клеток в среде RPMI-1640 (Lonza, кат. BE12-115F) с добавлением 10% донорской бычьей сыворотки с железом (DBSI, ThermoFischer, кат. № 10371029) и пенициллина/стрептомицина (Pen/Strep, Lonza, кат. DE17-603E), клетки подсчитывали по трипановому синему (Sigma Aldrich, кат. T8154) и концентрировали до 2×10^7 клеток/мл.

Клетки Wien 133 собирали, промывали (дважды в PBS, 1200 об/мин, 5 мин), собирали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% DBSI и Pen/Strep в концентрации 1×10^6 клеток/мл, к которым добавляли 15 мкл реагента DELFIA BATDA. (Перкин Элмер, кат. C136-100, 5 мкл/ 3×10^6 клеток). Смесь инкубировали на водяной бане в течение 20 минут при 37°C. После промывки клеток (пять раз в 50 мл PBS, 1200 об/мин, 5 мин) клетки ресуспендировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% DBSI и Pen/Strep, подсчитывали по вытеснению трипанового синего и разбавляли до концентрации 2×10^5 клеток/мл.

Для эксперимента ADCC 50 мкл меченных BATDA клеток Wien 133 (10000 клеток/лунку) предварительно инкубировали с серией концентраций (конечные концентрации 0,01-10 000 нг/мл в 10-кратных разведениях) IgG1-CAMPATH-1H и/или антительные варианты IgG1-11B8 в общем объеме 150 мкл среды RPMI-1640 с добавлением 10% DBSI и Pen/Strep в 96-луночных микротитровальных планшетах с V-образным дном (Greiner Bio-One; кат. № 651101). Через 15 минут при комнатной температуре добавляли 50 мкл PBMC (1×10^6 клеток), в результате чего соотношение эффектор/мишень (E: T) составляло 100:1, и инкубировали в течение 2 часов при 37°C/5% CO₂. Чтобы определить максимальное количество лизиса клеток, 50 мкл меченных BATDA клеток Wien 133 (10000 клеток/лунку) инкубировали со 150 мкл среды RPMI-1640, дополненной 10% DBSI, Pen/Strep и буфером для лизиса DELFIA (0,03% Дигитонин и 19% ДМСО, Perkin Elmer, кат. № AD0116-A) в соответствии с рекомендациями производителей. Для определения степени спонтанного лизиса 50 мкл меченных BATDA клеток Wien 133 (10000 клеток/лунку) инкубировали в 150 мкл среды без каких-либо антител или эффекторных клеток.

Для измерения количества высвобожденного реагента BATDA планшеты центрифугировали (500 x g, 10 мин), 20 мкл надосадочной жидкости переносили в планшет для микротитрования DELFIA и добавляли 200 мкл раствора DELFIA Europium (Perkin Elmer, кат. № AD0116-B). Затем планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут при встряхивании. Европий-BATDA (EuTDA) измеряли на флуориметре с временным разрешением (микропланшетный ридер для мультидетекции Perkin Elmer EnVision 2104) и использовали для расчета процента опосредованного антителами лизиса следующим образом: (высвобождение образца - самопроизвольное высвобождение)/(максимальное высвобождение - самопроизвольное высвобождение) x 100%.

Введение мутации E430G и/или K439E в WT IgG1-CAMPATH-1H не имело эффекта на дозозависимое ADCC-опосредованное уничтожение клеток Wien 133 при тестировании в виде отдельных агентов (Фигура 8C). Введение мутации G236R, ингибирующей связывание с C1q, в IgG1-CAMPATH-E430G-K439E приводило к полному ингибированию активности ADCC отдельного агента, тогда как мутация K322A, ингибирующая связывание с C1q, не влияла на активность ADCC отдельного агента IgG1-CAMPATH-E430G-K439E на клетках Wien 133 (Фигура 8C). Все протестированные антительные варианты IgG1-11B8 показали значительную эффективность ADCC на клетках Wien 133 при тестировании в виде отдельных агентов, без значительных различий между вариантами IgG1-11B8, содержащими мутации S440K и/или E430G и/или E333S (Фигура 8D). Смеси IgG1-11B8-E333S-E430G-S440K с IgG1-CAMPATH-1H-G236R-E430G-K439E или IgG1-CAMPATH-1H-K322A-E430G-K439E оба показали значительную эффективность ADCC на клетках Wien 133 (Фигура 8D).

В заключение, мутация G236R сильно ингибировала ADCC-активность IgG-CAMPATH-E430G-K439E как в люминесцентном репортерном биоанализе ADCC, так и в анализе EuTDA ADCC *in vitro*. IgG-CAMPATH-E430G-K439E с мутацией K322A продемонстрировал пониженную активность в люминесцентном репортерном биоанализе ADCC, но показало сохранившуюся существенную активность ADCC в анализе EuTDA ADCC *in vitro*.

Пример 10: Анализ различных мутаций, усиливающих взаимодействие Fc-Fc, для селективной активности CDC смесей вариантов IgG1-CAMPATH-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q и вариантов IgG1-11B8-S440K с или без мутации, усиливающей связывание с C1q, на клетках Wien 133

В Примере 5 было описано, что введение мутации ингибирования связывания с C1q (G236R, K322A, E269K, K322E или P329R) в IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E

приводило к полному ингибированию активности CDC отдельного агента на Wien 133 и восстановлению активности CDC в смеси с IgG1-11B8-E430G-S440K. В Примере 6 было описано, что IgG1-11B8-E430G-S440K, содержащий мутацию, усиливающую связывание с C1q, такую как E333S, показал очень ограниченную активность CDC при тестировании в виде отдельных агентов в анализе CDC *in vitro* с использованием клеток Wien 133, но показал восстановление активности CDC в смеси с IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E. В Примере 7 было описано, что комбинации антитела к CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, содержащего мутацию ингибирования связывания с C1q G236R или K322A, с антителом против CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K, содержащим мутацию, усиливающую связывание с C1q. E333S показал селективную активность CDC в отношении клеток Wien 133, в то время как для отдельных агентов активность CDC не наблюдалась. Здесь этот принцип избирательной индукции активности CDC смесью варианта IgG1-CAMPATH-1H с мутацией, усиливающей Fc-Fc (такой как E430G), мутацией K439E и мутацией, усиливающей связывание с C1q (такой как G236R или K322A) с вариантом антитела IgG1-11B8 с мутацией, усиливающей Fc-Fc (такой как E430G), мутацией S440K и, возможно, мутацией, усиливающей связывание с C1q (такой как E333S), анализировали на предмет других мутаций, усиливающих Fc-Fc, таких как E345K, E345R и E345R-E430G в тесте CDC *in vitro* на клетках Wien 133. Анализ CDC *in vitro* с использованием клеток Wien 133 проводили с 20% NHS и сериями концентраций антител (конечный диапазон концентраций 0,003-10,0 мкг/мл в 3-кратных разведениях), по существу, как описано в Примере 2. Значения лизиса клеток и относительной площади под кривой (AUC) рассчитывали из числа PI-положительных клеток, как описано в Примере 2, в двух экспериментальных повторностях. AUC была нормализована к значениям для антитела отрицательного контроля IgG1-b12 (0%) и для положительного контроля IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%), в то время как представленные данные максимального лизиса отражают ненормализованный лизис клеток при 10 мкг/мл IgG.

Ошибка! Источник ссылки не найден.Ошибка! Источник ссылки не найден.

Вместе эти данные показывают, что избирательная активность CDC в отношении CD52-положительных/CD20-положительных клеток Wien 133 может быть достигнута с помощью композиций варианта IgG1-CAMPATH-1H-K439E, содержащего одну из мутаций, усиливающих взаимодействие Fc-Fc, таких как E430G, E345K или E345R, и

мутацию ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A, смешанного с вариантом IgG1-11B8-S440K, содержащим одну из мутаций, усиливающих взаимодействие Fc-Fc, с или без мутации, усиливающей связывание с C1q, такой как E333S. В заключение, активность CDC индивидуальных антител с различными мутациями, усиливающими взаимодействие Fc-Fc, можно контролировать путем введения мутации, ингибирующей самоолигомеризацию, в сочетании с модуляцией силы связывания с C1q. В заключение, активность CDC индивидуальных антител с различными мутациями, усиливающими взаимодействие Fc-Fc, можно контролировать путем введения мутации, ингибирующей самоолигомеризацию, в сочетании с модуляцией силы связывания с C1q.

Пример 11: Анализ различных мутаций, модулирующих связывание с C1q, для избирательной активности CDC смесей антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E и против CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A на клетках Wien 133

В Примере 7 описано, что комбинации анти-CD5 антитела IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, содержащие мутацию ингибирования связывания с C1q, такую как G236R или K322A, с антителом против CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K, содержащим мутации, усиливающие связывание с C1q, такие как E333S, K326W или K326A-E333A, показали избирательную активность CDC в отношении клеток Wien 133, в то время как активность CDC была незначительной или отсутствовала для отдельных агентов. Здесь альтернативные мутации, модулирующие связывание с C1q, были протестированы в различных комбинациях антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E и IgG1-11B8-E430G-S440K с целью супрессии активности CDC отдельных агентов и обеспечения максимального восстановления селективной активности CDC с помощью смесей вариантов анти-CD52 и анти-CD20 антител. Анализ CDC *in vitro* с использованием клеток Wien 133 проводили с 20% NHS и сериями концентраций антител (конечный диапазон концентраций 0,003-10,0 мкг/мл в 3-кратных разведениях), по существу, как описано в Примере 2. Значения лизиса клеток и относительные значения AUC рассчитывали из числа PI-положительных клеток, как описано в Примере 2, в двух экспериментальных повторностях. AUC была нормализована к значениям для антитела отрицательного контроля IgG1-b12 (0%) и для положительного контроля IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%), в то время как представленные данные максимального лизиса отражают ненормализованный лизис клеток при 10 мкг/мл IgG.

Во-первых, антительные варианты IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, содержащие замену в положении аминокислоты G236 (G236R или G236K (SEQ ID NO 83)) или положении G237 (G237A (SEQ ID NO 85), G237T (SEQ ID NO 89), G237Q (SEQ

ID NO 87) или G237R (SEQ ID NO 88)) или двойную мутацию G237A-K322A (SEQ ID NO 86) были объединены с IgG1-11B8-E430G-S440K с или без мутации, усиливающей связывание с C1q, E333S. Как показано в Error! Источник ссылки не найден.А, все протестированные мутации, модулирующие связывание с C1q в положении G236 или G237 в IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, привели к селективной активности CDC в смесях с IgG1-11B8-E430G-S440K с или без мутации усиления связывания с C1q, E333S, демонстрируя при этом незначительную активность CDC или ее отсутствие в виде отдельных агентов на клетках Wien 133. Напротив, смесь варианта IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, содержащего двойную мутацию G237A-K322A, не показывала восстановления активности CDC при сочетании с IgG1-11B8-E430G-S440K с или без мутации, усиливающей связывание с C1q, E333S. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**

Затем антительные варианты IgG1-11B8-E430G-S440K, содержащие мутацию(ы), усиливающую связывание с C1q, K326A (SEQ ID NO 110), E333A (SEQ ID NO 102), E333S или K236W-E333S (SEQ ID NO 157), были объединены с IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, содержащий мутацию ингибирования связывания с C1q, G236R или K322A. Как показано в Error! Источник ссылки не найден.В, антительные варианты IgG1-11B8-E430G-S440K, содержащие единственную мутацию, усиливающую связывание с C1q, K326A, E333A или E333S, сохранили отсутствие активности CDC в виде отдельных агентов на клетках Wien 133, тогда как вариант IgG1-11B8-E430G-S440K, содержащий двойную мутацию K236W-E333S, показал значительно большую активность CDC в виде отдельного агента. Все протестированные комбинации антительных вариантов IgG1-11B8-E430G-S440K, содержащих единственную мутацию, усиливающую связывание с C1q, K326A, E333A или E333S, с вариантами IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, содержащими мутацию ингибирования связывания с C1q G236R или K322A, показали восстановление активности CDC, при этом проявляя незначительную активность CDC или ее отсутствие в виде отдельных агентов на клетках Wien 133. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**

Антительные варианты IgG1-11B8-E430G-S440K, содержащие мутацию, усиливающую связывание с C1q, K326A или E333A, также были объединены с IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, содержащим мутацию, модулирующую связывание с C1q, в положении G237 (G237A, G237T, G237Q) или G237Q. Как показано на Фигуре 10В, все протестированные комбинации IgG1-11B8-E430G-S440K-K326A или IgG1-11B8-E430G-S440K-E333A с антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, содержащими одну из тестируемых мутаций в положении G237, приводили к селективной активности CDC, в то время как все отдельные агенты демонстрировали незначительную

активность CDC или ее отсутствие на клетках Wien 133.

Мутация G237A была введена в антительные варианты IgG1-11B8-E430G-S440K для супрессии FcR-опосредованных эффекторных функций в компоненте S440K (SEQ ID NO 105). Чтобы компенсировать потенциально пониженное связывание с C1q, G237A тестировали в комбинации с мутацией E333S, усиливающей связывание с C1q (SEQ ID NO 106). Варианты IgG1-11B8 комбинируют с IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R. Как показано в Error! Источник ссылки не найден. В, эти комбинации также показали избирательную активность CDC, в то время как отдельные агенты показали незначительную активность CDC или ее отсутствие в отношении клеток Wien 133. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**

В заключение, активность CDC отдельных антител с мутацией E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, можно контролировать путем введения мутации, ингибирующей самоолигомеризацию, в сочетании с различными мутациями, ингибирующими связывание с C1q. Максимальное восстановление активности комплемента с использованием таких антител было достигнуто путем смешивания с антителами, содержащими различные мутации, усиливающие связывание с C1q, и комплементарные мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, что позволило осуществить селективную гетероолигомеризацию на клетках, связанных с обоими антителами одновременно.

Пример 12: Анализ избирательной активности CDC на клетках Wien 133 для смесей вариантов анти-CD52-антитела и анти-CD20-антитела в каркасах изотипов различных человеческих IgG

Последовательности VH анти-CD52 CAMPATH-1H были клонированы в каркасах IgG1, IgG2, IgG3 и шарнирно-стабилизированного IgG4 (S228P) человека, содержащих мутации E430G-K439E-G236R, и последовательности VH анти-CD20 11B8 были клонированы в каркасы IgG1, IgG2, IgG3 шарнирно-стабилизированный Fc IgG4 (S228P) человека, содержащий мутации E430G-S440K-E333S. Различные комбинации этих вариантов изотипов анти-CD52 и анти-CD20 были протестированы на избирательную активность CDC. Анализ CDC *in vitro* с использованием клеток Wien 133 проводили с 20% NHS и сериями концентраций антител (конечный диапазон концентраций 0,003-10,0 мкг/мл в 3-кратных разведениях), по существу, как описано в Примере 2. Значения лизиса клеток и относительные значения AUC рассчитывали из числа PI-положительных клеток, как описано в Примере 2, в двух экспериментальных повторностях. AUC была нормализована к значениям для антитела отрицательного контроля IgG1-b12 (0%) и для положительного контроля IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%), в то

время как представленные данные максимального лизиса отражают ненормализованный лизис клеток при 10 мкг/мл IgG.

Смеси IgG2-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R и IgG2-11B8-E430G-S440K или IgG2-11B8-E430G-S440K-E333S показали восстановление активности CDC, однако со сниженной активностью CDC (AUC) по сравнению со смесью соответствующих антительных вариантов IgG1 (Фигура 11). IgG2-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R и IgG2-11B8-E430G-S440K не показали активности CDC отдельного агента, в то время как введение мутации, усиливающей связывание с C1q, E333S, в IgG2-11B8-E430G-S440K-E333S приводило к индукции некоторой активности CDC отдельным агентом на клетках Wien 133 (Фигура 11).

Не наблюдали активности CDC ни для одного из тестируемых отдельных агентов или смесей вариантов изотипа IgG3 (Фигура 11). Также для тестируемых отдельных агентов или смесей вариантов изотипа IgG4 не наблюдали активности CDC (Фигура 11).

Неожиданно оказалось, что смеси IgG2-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R с IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S и смеси IgG4-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R (SEQ ID NO 146) со стабилизированным шарниром с IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S показал частичное восстановление активности CDC, в то время как соответствующие отдельные агенты не индуцировали CDC на клетках Wien 133 (Фигура 11).

В заключение, активность CDC отдельных антител с различными остовами IgG, содержащими мутацию E430G, усиливающую взаимодействие Fc-Fc, можно контролировать путем введения мутации, ингибирующей самоолигомеризацию, в сочетании с мутациями, модулирующими связывание с C1q. Путем смешивания таких антител, содержащих комплементарные мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, активность CDC таких антител может быть восстановлена путем селективной гетероолигомеризации на клетках, связанных одновременно обоими антителами.

Пример 13: Селективность активности CDC с помощью смесей антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и антительных вариантов IgG1-CD37-37.3 к CD37 на клеточных линиях с различными уровнями экспрессии-мишени

Как описано в Примере 4, избирательная активность CDC за счет смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-K322E + IgG1-11B8-E430G-S440K может быть достигнута только на клетках, экспрессирующих достаточные уровни обеих мишеней, то есть CD20 и CD52. Кроме того, в Примере 7 описано, что максимальное уничтожение клеток Wien 133 с сохраненной селективностью в отношении комбинации антител было достигнуто с использованием IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, содержащего мутацию ингибирования связывания с C1q, такую как G236R или K322A, и IgG1-11B8-E430G-

S440K, содержащий мутацию, усиливающую связывание с C1q, такую как E333S. Здесь селективная активность CDC была протестирована для комбинации вариантов анти-CD52 антитела и вариантов анти-CD37 антитела в анализах CDC *in vitro* с использованием клеток Daudi и Wien 133. Анализы CDC *in vitro* с использованием клеток Daudi и Wien 133 проводили с 20% NHS и сериями концентраций антител (конечный диапазон концентраций 0,003-10,0 мкг/мл в 3-кратных разведениях), по существу, как описано в Примере 2. Значения лизиса клеток и относительные значения AUC рассчитывали из числа PI-положительных клеток, как описано в Примере 2, из двух экспериментальных повторов (Daudi) и одного эксперимента (Wien 133). AUC была нормализована к значениям для антитела отрицательного контроля IgG1-b12 (0%) и для положительного контроля IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

Было обнаружено, что клетки Daudi, экспрессирующие низкие уровни CD52 (таблица 2), устойчивы к индукции CDC всеми вариантами IgG1-CAMPATH-1H (WT, E430G, E430G-K439E, E430G-K439E-G236R и E430G-K439E-K322A), когда протестированы как отдельные агенты (Фигура 12A). Активность CDC IgG1-CD37-37.3-E430G на клетках Daudi (экспрессирующих высокие уровни CD37, данные не показаны) ингибировалась введением мутации S440K и частично восстанавливалась дополнительным введением мутации, усиливающей связывание E333S C1q. WT IgG1-CD37-37.3 не индуцировал активность CDC на клетках Daudi. Для смесей IgG1-CD37-37.3-E430G-S440K с вариантами IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, содержащими G236R или K322A, наблюдаемая активность CDC была аналогична активности в виде отдельного агента IgG1-CD37-37.3-E430G-S440K, демонстрируя отсутствие кооперативности с вариантами IgG1-CAMPATH-1H при низкой экспрессии CD52. Низкая кооперативность наблюдалась для смесей IgG1-CD37-37.3-E430G-S440K-E333S с вариантами IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E вариантов, содержащих C1q-ингибирующую мутацию G236R или K322A. Эти данные продемонстрировали, что мутация G236R, ингибирующая связывание с C1q, в IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E подавляла ложную коактивацию в клетках, экспрессирующих низкие уровни CD52.

Клетки Wien 133, экспрессирующие умеренные уровни CD37 (данные не представлены), оказались устойчивыми к индукции CDC всеми вариантами IgG1-CD37-37.3 (WT, E430G, E430G-S440K, E430G-S440K-E333S) при тестировании в виде отдельных агентов (Фигура 12B). Активность CDC IgG1-CAMPATH-1H-E430G на клетках Wien 133, экспрессирующих высокие уровни CD52 (ABC > 300000; таблица 2), была снижена до уровней WT IgG1-CAMPATH-1H путем введения мутации K439E. Дальнейшее введение мутации ингибирования связывания с C1q (IgG1-CAMPATH-1H-

E430G-K439E-G236R и IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-K322A) привело к полному ингибированию активности CDC для отдельных агентов на клетках Wien 133. Для смесей IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R или IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-K322A с IgG1-CD37-37.3-E430G-S440K или IgG1-CD37-37.3-E430G-S440K-E333S восстановление активности CDC наблюдалось до уровней выше, чем у WT IgG1-CAMPATH-1H, в то время как все эти варианты не проявляли активности CDC на клетках Wien 133 в виде отдельных агентов.

В заключение, избирательное восстановление эффективности CDC для смесей антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G и IgG1-CD37-37.3-E430G может быть установлено на клетках Wien 133, экспрессирующих заметные уровни как CD37, так и CD52, в то время как клетки Daudi экспрессируют низкие уровни CD52 может быть защищен от присутствия вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G, содержащих как мутацию, ингибирующую самоолигомеризацию, так и мутацию, ингибирующую связывание с C1q, G236R или K322A.

Пример 14: Селективная агонистическая активность DR5 смеси двух неперекрестно-блокирующих анти-DR5 антител на клетках VxPC-3

Смесь двух неперекрестно блокирующих антител против рецептора смерти 5 (DR5) IgG1-DR5-01-G56T-E430G + IgG1-DR5-05-E430G действуют как агонист DR5, вызывая уничтожение DR5-положительных раковых клеток (WO17093447). Здесь был проведен анализ жизнеспособности для изучения способности комбинаций антительных вариантов IgG1-DR5-01-G56T-E430G (K439E, K439E-G236R) с антительными вариантами IgG1-DR5-05-E430G (S440K, S440K-E333S) индуцировать уничтожение клеток рака поджелудочной железы человека VxPC-3 (ATCC, кат. № CRL-1687), которые выражают низкие уровни DR5 (данные не показаны). Клетки VxPC-3 собирали трипсинизацией и пропускали через фильтр для клеток. Клетки осаждали центрифугированием в течение 5 минут при 1200 об/мин и ресуспендировали в культуральной среде при концентрации $0,5 \times 10^5$ клеток/мл (RPMI 1640 с 25 mM Hepar и L-глутамином (Lonza) + 10% DBSI (Life Technologies кат. № 10371- 029) + Pen/Strep). 100 мкл суспензий единичных клеток (5000 клеток/лунку) высевали в 96-луночные планшеты с плоским дном из полистирола (Greiner Bio-One, кат. № 655182) и оставляли для адгезии в течение ночи при 37°C. На следующий день 50 мкл образцов серии разведений антител (конечный диапазон концентраций 0,003-20 мкг/мл в 3-кратных разведениях) и 10 мкл очищенного исходного раствора C1q человека (Quidel, кат. A400, конечная концентрация 2,5 мкг/мл) и инкубировали в течение 3 дней при 37°C. В качестве положительного контроля клетки инкубировали с 5 мкМ стауроспорином (Sigma Aldrich, кат. S6942). Жизнеспособность клеточных культур определяли с помощью

люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo (Promega, кат. № G7571), который определяет количество присутствующего АТФ, являющегося индикатором метаболически активных клеток. Из набора добавляли 15 мкл реагента раствора люциферина на лунку и перемешивали встряхиванием планшета в течение 2 минут при 500 об/мин. Затем планшеты инкубировали 1,5 часа при 37°C. 100 мкл надосадочной жидкости переносили в белый OptiPlate-96 (Perkin Elmer, кат. № 6005299) и измеряли люминесценцию на считывающем устройстве EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer). Данные были проанализированы и нанесены на график с использованием нелинейной регрессии (сигмоидальная доза-реакция с переменным наклоном) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Процент жизнеспособных клеток рассчитывали по следующей формуле: % жизнеспособных клеток = [(люминесценция образца антитела - люминесценция образца стауроспорина)/(люминесценция образца без антител - люминесценция образца стауроспорина)] * 100.

Ни один из протестированных отдельных агентов не вызывал гибель клеток ВхРС-3 (Фигура 13А), тогда как комбинация IgG1-DR5-01-G56T-E430G + IgG1-DR5-05-E430G индуцировала дозозависимое уничтожение клеток ВхРС-3 (Фигура 13В). Это селективное уничтожение сохранялось в комбинации IgG1-DR5-01-G56T-E430G-K439E + IgG1-DR5-05-E430G-S440K, что указывает на то, что оба антитела образуют гетерогексамеры. Путем модуляции сайтов связывания C1q было обнаружено, что индукция гибели клеток ВхРС-3 за счет активности агониста DR5 была наиболее эффективной с комбинацией IgG1-DR5-01-G56T-E430G-K439E (без мутации ингибирования связывания C1q) + IgG1-DR5-05-E430G-S440K-E333S (с мутацией, усиливающей связывание C1q, E333S), и несколько снижается с помощью комбинации IgG1-DR5-01-G56T-E430G-K439E-G236R (с мутацией, ингибирующей связывание C1q, G236R) + IgG1-DR5-05-E430G + S440K (без мутации, усиливающей связывание C1q). Другая протестированная комбинация IgG1-DR5-01-G56T-E430G-K439E-E333S (с мутацией ингибирования связывания с C1q) + IgG1-DR5-05-E430G-S440K-E333S (с мутацией, усиливающей связывание C1q, E333S) показала эффективность, аналогичную IgG1-DR5-01-G56T-E430G + IgG1-DR5-05-E430G.

В заключение следует отметить, что введение C1q-модулирующих мутаций не повлияло на селективное уничтожение клеток ВхРС-3 путем гетероолигомеризации смесей анти-DR5 антител. Скорее, эффективность смеси была пропорциональна ожидаемой объединенной avidности связывания с C1q структуры гетеро-олигомерного антитела, образованной в клетках ВхРС-3 после связывания DR5.

Пример 15: Анализ влияния различных мутаций ингибирования связывания

с C1q в анти-CD52-антителе IgG1-CAMPATH-1H-E430G на активность CDC

Эффекты введения различных мутаций ингибирования связывания с C1q в IgG1-CAMPATH-1H-E430G (G237A, G236R, A327K, K322E или P329R) сравнивали в анализах CDC *in vitro* с использованием клеток Wien 133. Анализ CDC *in vitro* с использованием клеток Wien 133 проводили с 20% NHS и концентрациями антител в серийных разведениях (диапазон конечных концентраций 0,002-40,0 мкг/мл в 4-кратных разведениях), по существу, как описано в разделе **Ошибка! Источник ссылки не найден..** Лизис клеток рассчитывали по количеству PI-положительных клеток, измеренному с помощью проточной цитометрии на сортировщике Intellicyt iQue™, усредненных по трем экспериментальным повторам. Значения относительных площадей под кривой (AUC) представляют собой нормализацию к минимальному лизису (0% с отрицательным контролем IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K (не показано)) и максимального лизиса (100% с IgG1-CAMPATH-1H-E430G). **Error! Источник ссылки не найден.** показывает, что мутация G237A (SEQ ID NO: 124) не влияла на активность CDC IgG1-CAMPATH-1H-E430G в отношении клеток Wien 133. Введение мутации G236R (SEQ ID NO: 123) или A327K (SEQ ID NO: 63) привело к частичному снижению активности CDC, тогда как мутация K322E (SEQ ID NO: 132) привела к снижению активности CDC до остаточного уровня ниже уровня для WT IgG1-CAMPATH-1H. Только мутация P329R (SEQ ID NO: 133) приводила к полному ингибированию активности CDC IgG1-CAMPATH-1H-E430G-P329R на клетках Wien 133. **Ошибка! Источник ссылки не найден.Ошибка! Источник ссылки не найден.**

Пример 16: Связывание FcRn антительными вариантами анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и антительными вариантами анти-CD20 IgG1-11B8

Неонатальный Fc-рецептор (FcRn) ответственен за длительный период полужизни IgG в плазме путем защиты от деградации IgG. После интернализации антитела, FcRn связывает Fc-области антитела в эндосомах, в которых взаимодействие стабильно в слабо кислой среде (pH 6,0). При рециркуляции в плазматическую мембрану, где окружающая среда является нейтральной (pH 7,4), взаимодействие теряется и антитело высвобождается обратно в кровоток. Это влияет на период полужизни IgG в плазме.

Иммуноферментный анализ связывания FcRn (ELISA) был проведен для оценки связывания FcRn человека с анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H с E430G, K439E и мутациями, ингибирующими связывание с C1q, G236R или K322A, и анти-CD20 IgG1-11B8 с E430G, S440K и мутацией, усиливающей связывание C1q, E333S. 96-луночные планшеты Streptawell (Roche, кат. № 1734776001) покрывали 5 мкг/мл (100 мкл/лунку) рекомбинантно продуцированным биотинилированным внеклеточным доменом FcRn

человека [FcRnhsECDHis-B2M-BIO, то есть внеклеточным доменом FcRn человека с C-концевой меткой His (FcRnhsECDHis; SEQ ID NO 155) в виде димера с бета2-микроглобулином (B2M; SEQ ID NO 156)], разведенным в PBS с добавлением 0,05% Tween 20 (PBST) плюс 0,2% BSA в течение 2 часов при встряхивании при комнатной температуре (RT). Планшеты трижды промывали PBST. Последовательно разведенные образцы антител (диапазон конечных концентраций 0,0005-40 мкг/мл в 5-кратных разведениях в PBST/0,2% BSA, pH 6,0 или pH 7,4) добавляли и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании. Планшеты промывали PBST/0,2% BSA, pH 6,0 или pH 7,4. Конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) поликлональные козы антитела против легкой цепи каппа человека (1: 5,000; Sigma, кат. № A-7164), разведенные в PBST/0,2% BSA, pH 6,0 или pH 7,4, и планшеты инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании. После промывки PBST/0,2% BSA, pH 6,0 или pH 7,4, 100 мкл 2,2'-азино-бис (3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) (ABTS; 1 мг/мл; Roche кат. № 11112422001 и 11112597001) добавляли в качестве субстрата и планшеты инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. Реакцию останавливали, используя 100 мкл 2% щавелевой кислоты (Riedel de Haen, кат. № 33506), инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре и измеряли поглощение при 405 нм с использованием ридера ELISA. Логарифмически преобразованные данные анализировали путем подбора сигмоидальных кривых доза-ответ с переменным наклоном с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

Все протестированные антительные варианты IgG1-CAMPATH-1H не показали связывания с FcRn человека при pH 7,4 (Фигура 15A) и показали эффективное связывание FcRn при pH 6,0 (Фигура 15B). Очевидные различия в связывании между тестируемыми вариантами IgG1-CAMPATH-1H были интерпретированы как незначительные, учитывая разброс между кривыми связывания вариантов K439E IgG1-CAMPATH-1H (очевидный нижний конец) и варианта E430G-K439E (очевидный верхний конец) и разброс между максимальным связыванием FcRn IgG1-b12 и IgG1-CAMPATH-1H с доменами Fc дикого типа, несущими сайт связывания FcRn (Фигура 15B, C). Все протестированные антительные варианты IgG1-11B8 не показали связывания с FcRn человека при pH 7,4 (Фигура 15D) и эффективного связывания FcRn при pH 6,0 (Фигура 15E). Введение усиливающей связывание с C1q мутации E333S в IgG1-11B8-E430G-S440K не влияло на связывание с FcRn человека (Фигура 15E, F). Вместе эти данные показали, что анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H с E430G, K439E и мутациями, ингибирующими связывание C1q, G236R или K322A, и анти-CD20 IgG1-11B8 с E430G, S440K и мутацией, усиливающей

связывание с C1q, E333S, продемонстрировали нормальное связывание с FcRn человека.

Пример 17: Фармакокинетический (ФК) анализ антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8, содержащих мутации E430G, K439E, S440K и/или K322E и их комбинации.

Эффект мутации K439E, S440K, E430G и K322E на скорость клиренса IgG1-CAMPATH-1H и/или IgG1-11B8 изучался в эксперименте ФК на мышах SCID.

Скорость клиренса IgG1-CAMPATH-1H-E430G, -K439E, -E430G-K439E и -K322-E430G-K439E сравнивали со скоростью клиренса WT IgG1-CAMPATH-1H, а скорость клиренса IgG1-11B8-E430G, -S440K, -E430G-S440K и -K322-E430G-S440K сравнивали с WT IgG1-11B8. Кроме того, также определяли скорость клиренса комбинаций антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H с антительными вариантами IgG1-11B8, как показано на Фигуре 16C и Фигуре 16D, и сравнивали ее с клиренсом комбинации WT IgG1-CAMPATH-1H с WT IgG1-11B8.

Мыши в этом исследовании содержались в Центральном помещении для лабораторных животных (Утрехт, Нидерланды) и содержались в соответствии с надлежащей практикой в отношении животных, определенной в FELASA, AAALAC и ISO 9001:2000 в аккредитованном учреждении для животных (GDL). Все эксперименты проводились в соответствии с голландским законом о защите животных (WoD), переведенным из директив (2010/63/EU) и одобренным голландским комитетом по этике животных (CCD) и местным органом по защите животных. Самкам мышей SCID (CB-17/IcrHan®Hsd-Prkdcscid, Envigo) в возрасте 11-12 недель (3 мыши в группе) внутривенно вводили 500 мкг антитела (500 мкг для отдельного агента; 250 мкг + 250 мкг для антитела. смесь) (25 мг/кг) в объеме инъекции 200 мкл. Образцы крови по 50 мкл собирали из подкожной вены, чередуя пункцию щечной вены через 10 минут, 4 часа, 1 день, 2 дня, 7 дней, 14 дней и 21 день после введения антител. Кровь собирали в содержащие гепарит сосуды и центрифугировали в течение 10 минут при 14000 g. Образцы плазмы 20 мкл разбавляли 380 мкл PBS и хранили при -20°C до определения концентраций антител. Общие концентрации IgG человека определяли с помощью сэндвич-ELISA. Мышиный клон MH16 mAb против IgG человека-каппа (CLB Sanquin, кат. № M1268) использовали в качестве улавливающего антитела и наносили 100 мкл в течение ночи при 4°C на 96-луночные микропланшеты для ELISA (Greiner, кат. № 655092) в концентрации 2 мкг/мл в PBS. Планшеты блокировали путем инкубации на шейкере для планшетов в течение 1 часа при комнатной температуре с PBS с добавлением 0,2% BSA. После промывки добавляли 100 мкл разбавленных образцов плазмы и инкубировали на шейкере для планшетов в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты трижды промывали

300 мкл PBST и затем инкубировали на шейкере для планшетов в течение 1 часа при комнатной температуре со 100 мкл козьего иммуноглобулина против IgG человека, меченного пероксидазой (Jackson, кат. № 109-035-098; 1: 10.000 в PBST с добавлением 0,2% BSA). Планшеты снова трижды промывали 300 мкл PBST перед инкубацией в течение 15 минут при комнатной температуре со 100 мкл субстрата ABTS, защищенного от света. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2% щавелевой кислоты и инкубацией в течение 10 минут при комнатной температуре. Поглощение измеряли на микропланшетном ридере (Biotek, Уинуски, Вермонт) при 405 нм. Концентрация была рассчитана с использованием введенного материала в качестве контрольной кривой. В качестве контроля в планшете включили белок миеломы человека, содержащий IgG1 каппа (The Binding Site, кат. № BP078). Концентрации IgG человека (в мкг/мл) были нанесены на график (Фигура 16А для вариантов IgG1-CAMPATH-1H, фигура 16В для вариантов IgG1-11B8 и фигура 16С для комбинаций) и площадь под кривой (AUC) рассчитывалась с использованием программного обеспечения Graphpad Prism. Показатели клиренса до последнего дня забора крови (21 день) определяли по формуле $D \cdot 1000 / AUC$, где D - доза инъекции (25 мг/кг) (Фигура 16D).

Скорость клиренса всех вариантов IgG1-CAMPATH-1, включая WT, была немного выше, чем клиренс вариантов IgG1-11B8 и предсказанная кривая IgG1 (на основе 2-компарментной модели).

Введение мутации E430G как в IgG1-CAMPATH-1H, так и в IgG1-11B8 привело к небольшому увеличению скорости клиренса этих антител. Введение мутаций K439E или S440K и/или K322E в IgG1-CAMPATH-1H-E430G и IgG1-11B8-E430G привело к скорости клиренса, сравнимой со скоростью клиренса WT IgG1-CAMPATH-1H и WT IgG1-11B8, соответственно (Фигура 16D). Все протестированные комбинации вариантов IgG1-CAMPATH-1H с вариантами IgG1-11B8 показали скорости клиренса, которые были сопоставимы с таковой для комбинации антител WT IgG1-CAMPATH-1H + IgG1-11B8.

Вместе эти данные показали, что анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H с мутациями E430G, K439E, E430G-K439E или E430G-K439E-K322E и анти-CD20 IgG1-11B8 с мутациями E430G, S440K, E430G-S440K or E430G-S440K-K322E и их смеси, показали скорость клиренса, аналогичную таковой для антител IgG1 дикого типа.

Пример 18: Влияние мутаций G236R, G237T, K326A или E333S на связывание FcγR in vitro анти-CD52 или анти-CD20 антителами с мутацией, усиливающей гексамеризацию, K439E или S440K

Используя очищенные антитела, в анализах ELISA тестировали связывание антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H или IgG1-11B8 с димерными ECD FcγRIIA

аллотипа 131H, Fc γ R1IA аллотипа 131R, Fc γ R1IB, Fc γ R1IIA аллотипа 158F и Fc γ R1IIA аллотипа 158AV. Для обнаружения связывания с димерными вариантами Fc γ R 96-луночные планшеты Microton для ELISA (Greiner, Германия) покрывали в течение ночи при 4°C козьим F(ab')₂ против IgG-F(ab')₂ человека (Jackson Laboratory, 109-006-097, 1 мкг/мл) в PBS, промывали и блокировали 200 мкл/лунку PBS/0,2% BSA в течение 1 ч при комнатной температуре (RT). С промывками между инкубациями планшеты последовательно инкубировали со 100 мкл/лунку серии разведений антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H или IgG1-11B8 (0,0013-20 мкг/мл с пятикратным шагом) в PBST/0,2% BSA в течение 1 ч при комнатной температуре, 100 мкл/лунку димерных, His-меченных, C-концевых биотинилированных вариантов Fc γ R ECD (1 мкг/мл) в PBST/0,2% BSA в течение 1 часа при RT и со 100 мкл/лунку стрептавидина polyHRP (CLB, M2032, 1:10.000) в PBST/0,2% BSA в качестве детектирующего антитела в течение 30 мин при комнатной температуре. Проявление проводили в течение около 20 (IIA-131H) или 30 (IIA-131R, IB, IIIA-158V, IIIA-158F) минут с 1 мг/мл ABTS (Roche, Мангейм, Германия). Для остановки реакции добавляли 100 мкл 2% щавелевой кислоты. Поглощение измеряли при 405 нм в считывающем устройстве для микропланшетов (BioTek, Уинуски, Вермонт). Строили график связывания Fc γ R при концентрации антитела 20 мкг/мл. Данные основаны на трех независимых повторах, нормализованных для каждого эксперимента относительно фонового сигнала в ELISA (без контроля антител, 0%) и внутреннего стандарта IgG1-11B8-E430G-S440K, установленного на 100%.

Поскольку Fc γ R-опосредованные эффекторные функции могут быть менее чувствительны к регуляции гексамеризации IgG, чем CDC, полная селективность цитотоксичности для зависимых смесей, регулируемая гексамеризацией, может потребовать супрессии связывания Fc γ R с каждым отдельным антителом в смеси, особенно в присутствии эффекторной клетки, экспрессирующей рецепторы Fc γ R. Когда мутации G236R или G237T, ингибирующие связывание с C1q, были введены в антитело IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, связывание с вариантами Fc γ R IIA, IB и IIIA было сильно ингибировано, что детектировалось с помощью ELISA (Фигура 17). Когда мутации K326A или E333S, усиливающие связывание с C1q, были введены в IgG1-11B8-E430G-S440K, мутация K326A привела к увеличению связывания со всеми тестируемыми вариантами Fc γ R, в то время как мутация E333S уменьшила связывание с вариантами Fc γ R IIA/IB и IIIA на ~ 50 и ~ 20 %, соответственно (Фигура 17). Дальнейшая супрессия связывания Fc γ R с IgG1-11B8-E430G-S440K, IgG1-11B8-K326A-E430G-S440K или IgG1-11B8-E333S-E430G-S440K может потребовать дополнительных мутаций, таких как мутация G237A, испытанная в Примере 19.

В заключение, в то время как варианты IgG1-11B8-E430G-S440K с мутациями K326A или E333S сохраняют связывание с FcγR, варианты IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, содержащие мутации G236R или G237T, не проявляют детектируемого связывания с вариантами FcγR IIА, IIВ и IIIА.

Пример 19: Анализ различных мутаций, модулирующих связывание с C1q, для избирательной активности CDC смесей антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E и против CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A на клетках Wien 133

В Примере 11 было показано, что введение мутации G237A, ингибирующей связывание FcγR, в варианты IgG1-11B8-E430G-S440K с или без мутации E333S, усиливающей связывание с C1q, не снижало активности CDC при 10 мкг/мл IgG в сочетании с вариантом IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, содержащий мутацию G236R, ингибирующую связывание с C1q. Здесь другая мутация ингибирования связывания с C1q (G237T) была введена в IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E и протестирована в комбинации с IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A и IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A-E333S. Анализ CDC *in vitro* с использованием клеток Wien 133 проводили с 20% NHS и сериями концентраций антител (конечный диапазон концентраций 0,01-40,0 мкг/мл в 3,3-кратных разведениях), по существу, как описано в Примере 2. Значения лизиса клеток и относительные значения AUC рассчитывали по количеству PI-положительных клеток, как описано в примере 2, в трех экспериментальных повторах. AUC была нормализована к значениям для антитела отрицательного контроля IgG1-b12 (0%) и для положительного контроля IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%), в то время как представленные данные максимального лизиса отражают ненормализованный лизис клеток при 40 мкг/мл IgG.

Поскольку FcγR-опосредованные эффекторные функции могут быть менее чувствительны к регуляции гексамеризации IgG, чем CDC, полная селективность цитотоксичности для зависимых смесей, регулируемая гексамеризацией, может потребовать супрессии связывания FcγR с каждым отдельным антителом в смеси, особенно в присутствии эффекторной клетки, экспрессирующей рецепторы FcγR. Введение мутации G236R и G237T в IgG1-Campath-E430G-K439E сильно супрессировало связывание FcγR (Пример 18), но IgG1-11B8-E430G-S440K показало обычное связывание FcγR. Для супрессии связывания FcγR компонента 11B8 в тестируемых смесях мутацию G237A вводили в антитело IgG1-11B8-E430G-S440K с или без дополнительной мутации E333S. Как показано на Фигуре 18, введение мутации ингибирования связывания с C1q G237R или G237T эффективно снижает активность отдельного агента компонента IgG1-

CAMPATH-1H-E430G-K439E, сохраняя при этом полную активность CDC в комбинации с IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A или IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A-E333S на клетках Wien 133.

В заключение отметим селективность CDC-активности антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H +анти-CD20 IgG1-11B8-G237A с мутацией E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, и мутацией K439E или S440K, ингибирующей самоолигомеризацию, соответственно, была увеличена введением мутации G236R или G237T, ингибирующей связывание с C1q, в компонент анти-CD52 K439E. Введение мутации E333S, усиливающей связывание с C1q, в вариант 11B8 не увеличивало восстановление активности CDC в комбинациях, поскольку максимальное восстановление активности комплемента уже было достигнуто с IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A (с G237A для ингибирования связывания Fc γ R).

Пример 20: Истощение подмножества гематологических клеток комбинациями взаимозависимых антител

В Примере 19 активность CDC была показана на клетках Wien 133 для смесей вариантов анти-CD52 and анти-CD20 антител, разработанных для взаимозависимого способа. Специфичность смесей зависимых антител проверяли в анализах цитотоксичности цельной крови. CD52 экспрессируется как на Т-клетках, так и на В-клетках, тогда как CD20 экспрессируется на В-клетках, но по существу не на Т-клетках. Таким образом, можно ожидать, что смесь независимо действующих антител, нацеленных на CD52 и CD20, устранил как Т-клетки, так и В-клетки, в то время как смесь строго зависимых антител будет исключать истощение В-клеток, поскольку они экспрессируют как CD52, так и CD20. Поэтому цель эксперимента состояла в том, чтобы проверить, какие смеси вариантов анти-CD52 и анти-CD20 антител могут истощать В-клетки, не влияя на популяцию Т-клеток.

Анонимные образцы крови, обработанной гирудином, были получены в Университетском медицинском центре Утрехта. В течение первого дня готовили смеси антител, нацеленных на CD52, CD20 и gp120, в среде RPMI 1640 с добавлением 0,2% BSA. Антитела переносили на планшеты, содержащие 30 мкл обработанной гирудином крови в RPMI/0,2% BSA в конечном объеме 100 мкл при конечной концентрации антител 10 мкг/мл, и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 18 часов. На второй день к смесям добавляли равный объем буфера для лизиса красных кровяных телец (RBC), после чего клетки собирали центрифугированием (3 минуты при 300 gcf). Этот шаг повторяли до тех пор, пока все эритроциты не были лизированы, что оценивали по прозрачности смеси.

Затем добавляли смесь детектирующих антител, направленных против различных

гематологических субпопуляций, меченных флуоресцентными красителями, и смеси инкубировали в течение 30 минут при 4°C. После трех стадий промывки, выполненных с помощью буфера FACS, клетки ресуспендировали в буфере FACS, и относительные количества оставшихся популяций клеток определяли проточной цитометрией с использованием LSR Fortessa X20 FACS (BD). Параллельно с этим проводятся процедуры окрашивания компенсационных контрольных гранул (UltraComp eBeads, Thermo Scientific кат. № 01-2222) с использованием индивидуальных реагентов для иммуноанализа или фиксируемого красителя для оценки жизнеспособности (FVS), которые выявляли проточной цитометрией. Все стадии выполнялись на льду. В качестве реагентов для обнаружения использовали анти-CD3, меченные efluor 450 (e-biosciences кат. № 48-0037), CD19, меченные BV711 (Biolegend кат. № 302245), CD66b, меченные PE-Cy7 (Biolegend кат. № 302245), CD66b, меченные PE-Cy7 (Biolegend кат. № 564406). Вкратце, жизнеспособные клетки блокировали путем исключения FVS-положительных клеток и дублетов. Внутри популяции жизнеспособных клеток миелоидные клетки были заблокированы экспрессией CD66b^{high}, в то время как лимфоидные клетки были разделены на Т-клетки посредством экспрессии CD3^{high}/CD19^{low}/CD66b^{low} и В-клетки посредством экспрессии CD3^{low}/CD19^{high}/CD66b^{low}; оставшиеся лимфоидные клетки CD3^{low}/CD19^{low}/CD66b^{low} могли содержать NK-клетки, но не были дополнительно охарактеризованы в этих экспериментах. Образцы крови пяти разных здоровых доноров были протестированы в трех независимых экспериментах.

В отличие от анализов CDC на линиях опухолевых клеток, анализы цельной крови проводят в присутствии эффекторных клеток, экспрессирующих FcγR, которые могут опосредовать ADCC и ADCP, поэтому истощение клеток крови может быть опосредовано различными эффекторными механизмами, помимо CDC. Поскольку FcγR-опосредованные эффекторные функции могут быть менее чувствительны к гексамеризации IgG, чем CDC, может потребоваться дополнительное подавление FcγR-опосредованных эффекторных функций, чтобы цитотоксичность стала зависимой от связывания двух реагентов, образующих гетерогексамер в непосредственной близости. Относительное количество В-клеток и Т-клеток в популяции лимфоцитов варьировало приблизительно от 1,5-6% и 20-40%, соответственно у разных доноров (Фигура 19А). Действительно, смесь CD52-направленного IgG1-Campath-1H-E430G и CD20-направленного IgG1-11B8-E430G истощила все Т-клетки (экспрессирующие CD52) и В-клетки (экспрессирующие CD52 и CD20). Смесь IgG1-Campath-1H-E430G-K439E + IgG1-11B8-E430G-S440K, основанная на мутациях, раскрытых в WO2013004842, не была взаимозависимой в этой схеме анализа (Фигура 19А). IgG1-Campath-1H-E430G-K439E проявлял значительную активность

отдельного агента как в отношении В-клеток, так и Т-клеток, что можно объяснить как активностью, опосредованной FcγR, так и остаточной активностью CDC, наблюдаемой на линиях опухолевых клеток при высоких концентрациях IgG (Пример 4). IgG1-11B8-E430G-S440K проявлял активность в виде отдельного агента в отношении В-клеток, что, вероятно, объясняется активностью, опосредованной FcγR. Действительно, смесь IgG1-Campath-1H-E430G-K439E + IgG1-11B8-E430G-S440K вызвала существенное истощение как В-клеток, так и Т-клеток. Напротив, смесь IgG1-Campath-1H-G236R-E430G-K439E + IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K показала избирательное истощение только В-клеток, а не Т-клеток, строго зависимым образом (Фигура 19А). Действительно, IgG1-Campath-1H-G236R-E430G-K439E не проявлял заметной активности в виде отдельного агента ни на В-, ни на Т-клетках, демонстрируя, что введение мутации G236R устраняло FcγR-опосредованную активность, как ожидалось из примера 18, в дополнение к супрессии активности CDC отдельного агента, как наблюдалось, например, в предыдущих примерах 5, 7 и 19. Введение мутации G237A, присутствующей в IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K, устраняет остаточную активность отдельного агента на В-клетках, скорее всего, за счет подавления остаточной активности, опосредованной FcγR.

Варианты IgG1-CD52-Campath-E430G-K439E, содержащие дополнительные мутации в положении G237, то есть G237A, G237T, G237Q или G237R, демонстрировали различные уровни активности в виде отдельного агента (Фигура 19В). Варианты IgG1-CD52-Campath-G237A-E430G-K439E и IgG1-CD52-Campath-G237T-E430G-K439E вызвали уменьшение количества Т-клеток в виде отдельных агентов. Напротив, варианты IgG1-CD52-Campath-G237Q-E430G-K439E и IgG1-CD52-Campath-G237R-E430G-K439E не проявили заметной активности в виде отдельного агента ни на В-клетках, ни на Т-клетках. Когда IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K, лишенный активности в виде отдельного агента, смешивали с IgG1-CD52-Campath-G237Q-E430G-K439E или с IgG1-CD52-Campath-G237R-E430G-K439E, наблюдали сильнодействующее и селективное истощение В-клеток, но не Т-клеток (Фигура 19В).

Аналогичные результаты были получены в присутствии IgG1-11B8-G237A-E333S-E430G-S440K, содержащего мутацию E333S, повышающую аффинность к C1q: этот компонент не проявлял заметной активности в виде отдельного агента на В-клетках или на Т-клетках, при смешивании с IgG1-CD52-Campath-G236R-E430G-K439E, IgG1-CD52-Campath-G237Q-E430G-K439E или IgG1-CD52-Campath-G237R-E430G-K439E приводили к сильному и избирательному истощению В-клеток, а не Т-клеток (Фигура 19С). Напротив, когда IgG1-11B8-G237A-E333S-E430G-S440K смешивали с IgG1-CD52-Campath-G237A-E430G-K439E или IgG1-CD52-Campath-G237T-E430G-K439E,

наблюдалось детектируемое истощение Т-клеток (Фигура 19С), что согласуется с результатами на Фигуре 19В.

Эффективность смесей взаимозависимых антител, нацеленных на В-клетки, экспрессирующие как CD52, так и CD20, также сравнивали с независимыми нацеленными на В-клетки антителами ритуксимаб, обинутузумаб, IgG1-11B8 и IgG1-11B8-E430G. Интересно, что глубина истощения В-клеток смесей строго зависимых антител, нацеленных как на CD52, так и на CD20, превышала таковую для ритуксимаба, обинутузумаба, IgG1-11B8 и IgG1-11B8-E430G (Фигура 19D). Это было верно для смесей IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K с IgG1-CD52-Campath-G236R-E430G-K439E, IgG1-CD52-Campath-G237Q-E430G-K439E или IgG1-CD52-Campath-G237R-E430G-K439E, все из которых показали избирательное истощение В-клеток, а не Т-клеток (Фигуры 19А/В).

В заключение, эти данные продемонстрировали, что комбинации двух антител, нацеленных на две разные мишени на клеточной поверхности, можно заставить работать строго взаимозависимым образом. Как следствие, селективное истощение гематологической субпопуляции, в данном случае В-клеток, экспрессирующих CD20, было достигнуто из общей популяции экспрессирующих CD52 клеток. Эти строго взаимозависимые комбинации антител состояли из одного антитела с мутациями Fc-домена E430G и K439E в дополнение к мутации G236R, G237Q или G237T, и одного антитела с мутациями Fc-домена G237A, E430G и S440K, с необязательной дополнительной мутацией E333S.

Пример 21: Повышенная селективность активности CDC на множестве клеточных линий за счет смешанных антительных вариантов путем введения мутаций ингибирования связывания с C1q, G236R или G237T, в анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G K439E в сочетании с вариантом анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K

В предыдущих примерах повышенная селективность CDC-активности была продемонстрирована введением мутаций, ингибирующих связывание с C1q, в IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E (K322E в примере 3, G236R или G237T в примере 19) в комбинации с антительными вариантами IgG1-11B8-E430G-S440K с или без мутации(ий) E333S, усиливающей связывание с C1q, и/или мутации G237A, ингибирующей связывание FcR. В данном случае селективность активности CDC на двойных положительных CD20/CD52 клетках после введения мутаций G236R или G237T, ингибирующих связывание с C1q, в IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E была протестирована на линиях опухолевых клеток человека с разными уровнями экспрессии CD52 и CD20 (см. Таблицу 4 ниже). Анализы CDC *in vitro* с использованием клеточных линий Daudi, Raji, Ramos, REN

и U-698-M проводили с 20% NHS и сериями концентраций антител (конечный диапазон концентраций 0,01-40,0 мкг/мл в 3,3-кратных разведениях), по существу, как описано в примере 2. Значения лизиса клеток и относительные значения AUC рассчитывали по количеству PI-положительных клеток, как описано в примере 2, в трех экспериментальных повторах. AUC была нормализована к значениям для антитела отрицательного контроля IgG1-b12 (0%) и для положительного контроля IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%), в то время как представленные данные максимального лизиса отражают ненормализованный лизис клеток при 40 мкг/мл IgG. γ

Таблица 4: Уровни экспрессии CD20 и CD52 на разных линиях клеток

Антитело (мишень)	ABC*				
	Daudi	Raji	Ramos	REN	U-698-M
IgG1-CAMPATH-1H (CD52)	1,0x10 ⁴	1,3x10 ⁵	2,7x10 ⁵	1,9x10 ⁵	1,4x10 ⁵
IgG1-11B8 (CD20)	1,7x10 ⁵	1,7x10 ⁵	1,1x10 ⁵	1,9x10 ⁴	1,0x10 ⁵

*ABC (antibody Binding Capacity) Способность антител к связыванию, определенная с помощью анализа QIFIKIT (данные не показаны)

Варианты IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией ингибирования связывания с C1q, G237R или G237T, не показали активности в виде отдельного агента (сравнимой с фоновыми уровнями) на всех тестируемых клеточных линиях с разными уровнями экспрессии CD52: Daudi (Фигура 20A), Raji (Фигура 20B), Ramos (Фигура 20C), REN (Фигура 20D) и U-698-M (Фигура 20E). Для клеточных линий Daudi, Ramos, Raji и U-698-M наблюдалось повышенное восстановление активности CDC при объединении с антительными вариантами IgG1-11B8-E430G-S440K с тестируемой мутацией E333S, усиливающей связывание с C1q (с или без мутации, ингибирующей Fc γ R, G237A) или K326A. Эффект мутаций, усиливающих связывание с C1q, K326A или E333S, в нацеленном на CD20 11B8 был менее выраженным, когда уровни экспрессии CD20 были ниже (REN: 19000 ABC CD20). В соответствии с целевыми уровнями экспрессии, CDC линии REN, экспрессирующей низкий CD20, сильно зависела от присутствия агента, нацеливающего на CD52, тогда как CDC линии клеток Daudi, экспрессирующей низкий CD52, сильно зависела от присутствия агента, нацеливающего на CD20. Действительно, AUC CDC и максимальный лизис, индуцированный IgG1-G236R-E430G-K439E + IgG1-11B8-E430G-S440K в клеточных линиях REN и Daudi, были значительно ниже, чем индуцированный комбинацией IgG1-Campath-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G, иллюстрирующий относительную селективность этой смеси в отношении CD20/CD52 двойных положительных клеточных линий Ramos, Raji и U-698-M. Чувствительность

CDC клеток Daudi с низкой экспрессией CD52 модулировалась присутствием мутации, усиливающей C1q, K326A, E333S или G237A-E333S, введенной в агент, нацеливающий на CD20.

В заключение необходимо отметить, что селективность активности CDC для комбинации IgG1-САМРАТН-1Н-E430G-K439E и IgG1-11B8-E430G-S440K может быть установлена независимо от целевых уровней экспрессии в различных клеточных линиях путем введения мутации, ингибирующей связывание с C1q, такой как как G236R или G237T в компоненте анти-CD52 E430G-K439E; эффективность смеси регулировали введением мутации, усиливающей связывание с C1q, такой как E333S или K326A, в компонент анти-CD20 E430G-S440K.

Пример 22: Пример 15: Селективность активности CDC с помощью смесей антительных вариантов анти-CD37 IgG1-CD37-37.3 и антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8 на клеточных линиях с различными уровнями экспрессии-мишени

В предыдущих примерах селективная активность CDC была показана для комбинаций антительных вариантов анти-CD52 с анти-CD20 (Ошибка! Источник ссылки не найден. Ошибка! Источник ссылки не найден. Ошибка! Источник ссылки не найден.) и антительных вариантов анти-CD52 с анти-CD37 (Ошибка! Источник ссылки не найден.). Здесь селективная активность CDC была протестирована для комбинации антительных вариантов анти-CD52 и антительных вариантов анти-CD37 в анализах CDC in vitro с использованием клеток Daudi и Wien 133. Анализы CDC in vitro с использованием клеток Daudi и В-лимфобластов WIL2-S (ATCC, CRL-8885) проводили с 20% NHS и сериями концентраций антител (конечный диапазон концентраций 0,005-10,0 мкг/мл в 3-кратных разведениях), по существу как описано в Егго! Источник ссылки не найден.. Культуральная среда для клеток WIL2-S состояла из RPMI 1640 с 25 mM Нерес и L-глутамина (Lonza, кат. № BE12-115F) с добавлением + 10% инактивированного нагреванием DBSI, 1 mM пирувата натрия (Lonza, кат. № BE13-115E) и 50 Ед/мл пен./стреп. Лизис клеток рассчитывали из числа PI-положительных клеток, усредненного по трем экспериментальным повторам и нормализованного к лизису клеток, измеренному для антитела отрицательного контроля IgG1-b12 (0%) и для 10 мкг/мл IgG1- САМРАТН-1Н-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).**Ошибка! Источник ссылки не найден.Ошибка! Источник ссылки не найден.Ошибка! Источник ссылки не найден.Ошибка! Источник ссылки не найден.Ошибка! Источник ссылки не найден.**

Клетки Daudi были устойчивы к индукции CDC WT анти-CD37 антителом IgG1-CD37-37.3 и WT анти-CD20 антителом IgG1-11B8 типа II при тестировании в виде отдельных агентов, в то время как некоторая активность CDC наблюдалась для смеси двух

антител WT (Фигура 21А). Введение мутации, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, привело к индукции активности CDC для обоих антител при тестировании как отдельных агентов и сильной активности CDC при тестировании в виде смеси. Активность CDC отдельного агента с помощью IgG1-CD37-37.3-E430G сильно ингибировалась введением мутации K439E и полностью ингибировалась дополнительным введением мутации ингибирования связывания G236R C1q. Активность CDC отдельного агента с помощью IgG1-11B8-E430G ингибировалась введением мутации S440K, также в присутствии дополнительной мутации E333S, усиливающей связывание с C1q. Для всех протестированных смесей мутантов антител IgG1-CD37-37.3 (содержащих E430G, E430G-K439E или E430G-K439E-G326R) с мутантами антител IgG1-11B8 (содержащих E430G, E430G-S440K или E430G-S440K-E333S) сильная активность наблюдалась на клетках Daudi.

На клетках WIL2-S активность CDC была очень низкой для всех антительных вариантов IgG1-CD37-37.3 (WT, E430G, E430G-K439E и E430G-K439E-E333S) при тестировании в виде отдельных агентов (Фигура 21В). Введение мутации E430G в анти-CD20 IgG1-11B8 антитела типа II привело к индукции активности CDC на клетках WIL2-S. Активность CDC отдельного агента с помощью IgG1-11B8-E430G сильно ингибировалась введением мутации S440K, в то время как введение дополнительной мутации E333S, усиливающей связывание с C1q, приводило к низкой активности CDC у IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S (Фигура 21В). Для всех протестированных смесей мутантов антител IgG1-CD37-37.3 (содержащих E430G, E430G-K439E или E430G-K439E-G326R) с мутантами антител IgG1-11B8 (содержащих E430G, E430G-S440K или E430G-S440K-E333S) сильную активность наблюдали на клетках WIL2-S.

В заключение, эти данные продемонстрировали избирательную активность CDC в отношении клеток Daudi и WIL2-S за счет смесей тестируемых антительных вариантов IgG1-CD37-37.3-E430G (K439E и K439E-G236R) с антительными вариантами IgG1-11B8-E430G (S440K и S440K-E333S), в то время как активность CDC была незначительной или отсутствовала у индивидуальных антител при тестировании в виде отдельных агентов.

Пример 23: Активность CDC на клетках Daudi композициями антительных вариантов анти-CD37 IgG1-CD37-37.3 и антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8, смешанных в разных соотношениях

В примере 22 была показана избирательная активность CDC для анти-CD37 антительных вариантов, смешанных с анти-CD20 антительными вариантами в соотношении 1:1, в анализах CDC *in vitro* с использованием клеток Daudi. Здесь был изучен эффект изменения соотношения между двумя взаимозависимыми антительными компонентами, присутствующими в смеси. Композиции, содержащие IgG1-CD37-37.3-G236R-E430G-K439E в концентрациях от 0,0005-10 мкг/мл и IgG1-11B8-E430G-S440K в концентрациях от 0,013-10 мкг/мл, были созданы в полнофакторном плане и протестированы в тесты CDC *in vitro*. Анализы CDC *in vitro* с использованием клеток Daudi проводили с 20% NHS, по существу, как описано в Примере 2. Лизис клеток рассчитывали по количеству PI-положительных клеток.

Клетки Daudi лизировали смесями IgG1-CD37-37.3-G236R-E430G-K439E и IgG1-11B8-E430G-S440K взаимозависимым образом. Отдельные агенты показали ограниченную активность: максимум 8% лизиса индуцировалось до 10 мкг/мл IgG1-CD37-37.3-G236R-E430G-K439E, смешанным с несвязывающимся контрольным антителом IgG1-b12, и максимум 7% лизис индуцировалось повышением до 10 мкг/мл IgG1-11B8-E430G-S440K, смешанного с IgG1-b12. Напротив, смеси IgG1-CD37-37.3-G236R-E430G-K439E и IgG1-11B8-E430G-S440K индуцировали эффективный лизис клеток Daudi для композиций, представляющих широкий диапазон различных соотношений антител (Таблица 5).

Примечательно, что когда связывание CD20 было насыщено за счет предоставления IgG1-11B8-E430G-S440K в концентрации 10 мкг/мл, добавление $\geq 0,12$ мкг/мл IgG1-CD37-37.3-G236R-E430G-K439E привело к лизису $\geq 70\%$ клеток Daudi. Обнаруживаемый лизис наблюдали для композиций, содержащих 10 мкг/мл IgG1-11B8-E430G-S440K и $\geq 0,013$ мкг/мл IgG1-CD37-37.3-G236R-E430G-K439E. Аналогичным образом, когда связывание CD37 было насыщенным с использованием 10 мкг/мл IgG1-CD37-37.3-G236R-E430G-K439E, $\geq 1,1$ мкг/мл IgG1-11B8-E430G-S440K индуцировало лизис $\geq 69\%$ клеток Daudi. Аналогичным образом, когда связывание CD37 было насыщенным с использованием 10 мкг/мл IgG1-CD37-37.3-G236R-E430G-K439E, $\geq 1,1$ мкг/мл IgG1-11B8-E430G-S440K индуцировало лизис $\geq 69\%$ клеток Daudi.

Это означает, что композиции антител, содержащие IgG1-CD37-37.3-G236R-E430G-K439E и IgG1-11B8-E430G-S440K в соотношении приблизительно от 1: 1000-1: 1 или 1: 1-1: 100, приводили к детектируемому лизису клеток Daudi, при условии, что

связывание, по меньшей мере, одна из двух мишеней CD37 и CD20 была насыщенным. Композиции антител, содержащие IgG1-CD37-37.3-G236R-E430G-K439E и IgG1-11B8-E430G-S440K в соотношении приблизительно от 1: 100-1: 1 или 1: 1-1: 10, дали лизис > 69% клеток Daudi при условии, что связывание хотя бы одной из двух мишеней было насыщенным.

В заключение, эти данные продемонстрировали, что композиции антител с сильно различающимся соотношением давали детектируемый и эффективный лизис клеток Daudi с помощью CDC, особенно когда связывание, по меньшей мере, одной из двух мишеней было насыщенным, в то время как детектируемый лизис не наблюдался, когда второй компонент отсутствовал или присутствовал при низкой численности.

В таблице 5 показана активность CDC для композиций, содержащих IgG1-CD37-37.3-G236R-E430G-K439E в концентрациях от 0,0005-10 мкг/мл и IgG1-11B8-E430G-S440K в концентрациях от 0,013 до 10 мкг/мл, смешанные в полнофакторном плане. Клетки Daudi инкубировали со смесями антител в присутствии 20% NHS. Лизис клеток Daudi рассчитывали по фракции PI-положительных клеток.

Лизис (%)	IgG мкг/мл	IgG1-CD37-37.3-G236R-E430G-K439E									
		10	3,3	1,1	0,37	0,12	0,041	0,013	0,0045	0,0015	0,0005
IgG1-11B8-E430G-S440K	10	93	92	92	87	70	39	14	6	7	6
	3,3	83	87	86	78	50	28	12	8	6	7
	1,1	69	63	61	52	35	16	6	6	6	6
	0,37	36	26	22	18	13	8	5	5	6	6
	0,12	12	10	9	9	7	6	5	5	4	5
	0,041	6	6	7	6	5	5	5	6	4	4
	0,013	5	5	6	6	6	5	5	4	5	5

Пример 24: Связывание с мишенью на клетках Wien 133 антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H

Связывание с клетками лимфомы Wien 133 анализировали с помощью проточной цитометрии для антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H с мутацией E430G или E345R, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, мутацией K439E, ингибирующей самоолигомеризацию, и одной из мутаций, ингибирующих связывание FcγR и модулирующих связывание с C1q, G236R, G237A или G237T. Суспензии клеток

промывали PBS и ресуспендировали в буфере FACS [PBS + 0,1% (масс./об.) Бычий сывороточный альбумин (BSA) + 0,02% (масс./об.) азида натрия] в концентрации 2×10^6 клеток/мл. Образцы суспензии клеток по 50 мкл (100000 клеток на лунку) высевали в полистирольные 96-луночные круглодонные планшеты (Greiner Bio-One; кат. № 650261) и инкубировали с образцами 50 мкл антител (конечные концентрации 0,0002 - 10 мкг/мл в 3-кратных разведениях) в течение 30 минут при 4°C. Клетки осаждали центрифугированием при 300x g в течение 3 минут при 4°C и трижды промывали 150 мкл буфера FACS. Клетки инкубировали с 50 мкл вторичного антитела, конъюгированного с R-фикоэритрином (R-PE), козьего антитела против F(ab')₂ IgG человека (Jackson ImmunoResearch, кат. № 109-116-098, 1: 200) в течение 30 минут при 4°C, в защищенном от света месте. Клетки дважды промывали 150 мкл буфера FACS, ресуспендировали в 30 мкл буфера FACS и связывание антител анализировали с помощью проточной цитометрии на сортере Intellicyt iQue. Максимальный уровень связывания (V_{max}) и кажущийся K_d определяли с помощью нелинейного регрессионного анализа кривых связывания со специфическим связыванием с помощью модели наклона Хилла, представленной в программе GraphPad Prism версии 8, после вычитания фонового сигнала, наблюдаемого для клеток, инкубированных только со вторичным антителом. Данные связывания нормализовали для каждого эксперимента относительно максимального уровня связывания (V_{max}), рассчитанного для IgG1-11B8 дикого типа.

На Фигуре 22А показано связывание, наблюдаемое для вариантов IgG1-CAMPATH-1H в репрезентативном эксперименте, в котором все протестированные антительные варианты показали аналогичное дозозависимое связывание с клетками Wien 133. Эти данные показывают, что введение мутаций E430G и K439E не влияет на связывание мишени на поверхности клетки. Сопоставимое связывание с мишенью наблюдали, когда мутацию E345R вводили вместо мутации E430G. Также введение любой из дополнительных мутаций G236R, G237A или G237T в IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E не имело эффекта на связывание мишени CD52 на поверхности клетки. При сравнении данных, собранных из трех независимых экспериментов, не наблюдали разницы в среднем максимальном связывании (V_{max}; Фигура 22В) и не наблюдали разницы в усредненном кажущемся K_d (Фигура 22С) для антительных вариантов по сравнению с антителами дикого типа.

Пример 25: Связывание с мишенью на клетках Raji антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8, содержащих мутации E430G-S440K

Связывание антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8 с мутацией E430G, усиливающей взаимодействие Fc:Fc, мутацией S440K, ингибирующей

самоолигомеризацию, и мутациями, модулирующими связывание с C1q, с клетками лимфомы Raji анализировали с помощью проточной цитометрии. Анализ связывания *in vitro* с использованием клеток Raji проводили с последовательными разведениями концентраций антител (диапазон конечных концентраций 0,0007-40 мкг/мл в 3-кратных разведениях), по существу, как описано в Примере 24. Связывание антител анализировали с помощью проточной цитометрии на сортере Intellicyt iQue. Максимальный уровень связывания (B_{max}) и кажущийся K_d определяли с помощью нелинейного регрессионного анализа кривых связывания со специфическим связыванием с помощью модели наклона Хилла, представленной в программе GraphPad Prism версии 8, после вычитания фонового сигнала, наблюдаемого для клеток, инкубированных только со вторичным антителом. Данные связывания нормализовали для каждого эксперимента относительно максимального уровня связывания (B_{max}), рассчитанного для IgG1-11B8 дикого типа.

На фигурах 23А и В показан типичный эксперимент по связыванию, демонстрирующий, что все протестированные антительные варианты IgG1-11B8 показали аналогичное дозозависимое связывание с клетками Raji. При усреднении по трем независимым экспериментам значения максимального связывания (B_{max}) и усредненные кажущиеся значения K_d антительных вариантов IgG1-11B8, несущих любую из упомянутых выше мутаций, были аналогичны таковым для IgG1-11B8 дикого типа (Фигура 23С-Е). Эти данные указывают на то, что введение одиночных или комбинированных мутаций E430G и S440K не влияло на связывание мишени на поверхности клетки. Введение любой из дополнительных мутаций, усиливающих связывание с C1q, K326A, E333A или E333S, мутации, ингибирующей связывание с C1q, G237A или комбинации мутаций, модулирующих связывание с C1q, G237A-E333S в IgG1-11B8-E430G-S440K, не оказывало влияния на связывание с мишенью CD20 на поверхности клетки.

Пример 26: Связывание с FcRn антительных вариантов анти-CD52 IgG1-SAMPATH-1H и против CD20 IgG1-11B8, содержащих мутации E430G и K439E или S440K

Неонатальный Fc-рецептор (FcRn) ответственен за длительный период полужизни IgG в плазме путем защиты от деградации IgG. После интернализации антитела, FcRn связывает Fc-области антитела в эндосомах, в которых взаимодействие стабильно в слабо кислой среде (pH 6,0). При рециркуляции в плазматическую мембрану, где окружающая среда является нейтральной (pH 7,4), взаимодействие теряется и антитело высвобождается обратно в кровотоки. Это влияет на период полужизни IgG в плазме.

Иммуноферментный анализ связывания FcRn с ферментом (ELISA) выполняли для

оценки связывания FcRn человека с анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H или анти-CD20 IgG1-11B8 с мутацией E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, мутацией K439E, ингибирующей самоолигомеризацию (в случае IgG1-CAMPATH-1H) или S440K (в случае IgG1-11B8) и любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, G237A, G237T, K326A, E333A или G237A-E333S. 96-луночные планшеты Streptawell (Roche, кат. № 1734776001) покрывали 2 мкг/мл (100 мкл/лунку) рекомбинантно продуцированным биотинилированным внеклеточным доменом FcRn человека [FcRnECDHis-B2M-BIO, то есть внеклеточным доменом FcRn человека с C-концевой меткой His (FcRnECDHis; SEQ ID 155) в виде димера с бета2-микроглобулином (B2M; SEQ ID 156)], разведенном в PBS в течение 2 часов при встряхивании при комнатной температуре (RT). Планшеты трижды промывали PBST. Образцы антител добавляли при конечной концентрации 40 мкг/мл в PBST/0,2% BSA, pH 6,0 или pH 7,4, и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании. Планшеты трижды промывали PBST/0,2% BSA, pH 6,0 или pH 7,4. Конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) поликлональные козы антигена против легкой цепи каппа человека (1: 5,000; Sigma, кат. № A-7164), разведенные в PBST/0,2% BSA, pH 6,0 или pH 7,4, и планшеты инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании. После трехкратной промывки PBST/0,2% BSA, pH 6,0 или pH 7,4, добавляли 100 мкл 2,2'-азинобис (3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты (ABTS; 1 мг/мл; Roche кат. № 11112422001)) в качестве субстрата и планшеты инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. Реакцию останавливали, используя 100 мкл 2% щавелевой кислоты (Riedel de Haen, кат. № 33506), инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре и измеряли поглощение при 405 нм с использованием ридера ELISA.

При pH 6,0 очень похожее связывание FcRn наблюдалось для антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-CAMPATH-1H дикого типа, содержащими мутации E430G или E430G-K439E, а также антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E. несущих, мутации, модулирующие связывание с C1q, G237A или G237T (Фигура 24A). Кроме того, антительные варианты IgG1-11B8 дикого типа, IgG1-11B8, несущие мутации E430G или E430G-S440K, и антительные варианты IgG1-11B8-E430G-S440K, содержащие мутации, модулирующие связывание с C1q, K326A, E333A, G237A или G237A-Fc333S, показали аналогичные связывание при pH 6,0 (Фигура 24B). IgG1-b12 показало низкое остаточное связывание с FcRn при pH 7,4, в отличие от других протестированных антител, которые все показали связывание, по существу, аналогичное фоновому сигналу, зарегистрированному для лунок, инкубированных без антител (Фигура 24C, D). В совокупности эти результаты показывают, что анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H

и анти-CD20 IgG1-11B8 с мутацией E430G, усиливающей гексамеризацию, мутациями K439E или S440K, ингибирующими самоолигомеризацию, и мутациями, модулирующими связывание с C1q, K326A, G237A, G237AT, E333A или G237A-E333S, показали нормальное связывание с FcRn человека.

Пример 27: Фармакокинетический (ФК) анализ антительных вариантов, несущих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q.

Фармакокинетические свойства антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и анти-CD20 IgG1-11B8, содержащих мутацию, усиливающую взаимодействие Fc-Fc, мутацию, ингибирующую самоолигомеризацию, и мутацию, модулирующую связывание с C1q, анализировали в исследовании на мышах. Антительные варианты тестировали как в виде отдельных антител, так и в виде смеси.

Мышей в этом исследовании содержали в Центральном помещении для лабораторных животных (Утрехт, Нидерланды) и содержали в индивидуально вентилируемых клетках с водой и кормом *ad libitum*. Все эксперименты соответствовали голландскому закону о защите животных (WoD), переведенному из директив (2010/63/EU), и были одобрены Голландской центральной комиссией по экспериментам на животных и местным комитетом по этике). Мышам SCID (CB-17/IcrHan @ Hsd-Prkdc ^{scid}, Envigo) внутривенно вводили 500 мкг антитела (IgG1-CAMPATH-1H дикого типа, его варианты, содержащие мутации E430G и K439E, а также мутации G237Q или G236R, IgG1-11B8 дикого типа, его варианты, несущие мутации E430G и S440K и либо мутации G237A, либо E333S, или комбинации варианта антитела IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8) с использованием 3 мышей на группу. Образцы крови по 50 мкл собирали из лицевой вены через 10 минут, 4 часа, 1 день, 2 дня, 7 дней, 14 дней и 21 день после введения антител. Кровь собирали в содержащие гепарит сосуды и центрифугировали в течение 5 минут при 10000 g. Плазму хранили при -20°C до определения концентраций антител.

Удельные концентрации человеческих IgG определяли с помощью ELISA, специфичного к общим hIgG. Мышиные антитела к человеческому IgG IgG2amm-1015-6A05-Fab (антитела собственного производства, партия 3233-025-EP, Genmab, Нидерланды), нанесенные на 96-луночные планшеты Microton для ELISA (Greiner, Германия) в концентрации 2 мкг/мл, использовали в качестве улавливающего антитела. После блокирования планшетов PBS с добавлением 0,2% бычьего сывороточного альбумина, образцы были добавлены, серийно разведены в буфере для ELISA (PBS с добавлением 0,05% твин 20 и 0,2% бычьего сывороточного альбумина) и инкубированы

на шейкере для планшетов в течение 1 ч при комнатной температуре (RT). Планшеты последовательно инкубировали с козьим иммуноглобулином против человеческих IgG (#109-035-098, Jackson, Вест-Грейс, Пенсильвания) и проявляли с помощью 2,2'-азино-бис (3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) (ABTS; Roche, Мангейм, Германия). Соответствующие материалы, использованные для инъекции, использовали в качестве контрольной кривой. Поглощение измеряли на микропланшетном ридере (Biotek, Уинуски, Вермонт) при 405 нм.

Клиренс антитела дикого типа IgG1-CAMPATH-1H и антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R и IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q был сопоставимым, хотя наблюдаемые концентрации IgG всех антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H, инъецированных мышам, были ниже ожидаемой кривой концентрации, основанной на двухкомпонентной модели, для антител IgG1 дикого типа у мышей SCID (Фигура 25A). Клиренс антитела дикого типа IgG1-11B8 и его вариантов, IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A и IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S, был сравним (Фигура 25B) друг с другом. В случае IgG1-11B8 и его вариантов кривая концентрации общего IgG1 была подобна кривой прогнозируемой концентрации для IgG1 дикого типа у мышей SCID. В соответствии с наблюдениями для отдельных антител, введение мутаций, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию или модулируют связывание с C1q, не влияет на фармакокинетику смесей антител IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 (Фигура 25C). Кривая концентрации общего IgG в смесях была подобна кривой прогнозируемой концентрации IgG1 дикого типа у мышей SCID, хотя и немного ниже.

Варианты IgG1-11B8 с мутациями E430G-S440K-G237A показали скорость выведения, аналогичную скорости выведения IgG1-11B8 дикого типа (Фигура 25D). Варианты IgG1-CAMPATH-1H с мутациями E430G-K439E-G236R или E430G-K439E-G237Q демонстрировали скорости клиренса, сходные с клиренсом IgG1-CAMPATH-1H дикого типа (Фигура 25D), в то время как клиренс всех вариантов IgG1-CAMPATH-1H был выше, чем у протестированных вариантов IgG1-11B8. Все протестированные комбинации вариантов IgG1-CAMPATH-1H с вариантами IgG1-11B8 показали скорости клиренса, которые были сопоставимы с таковой для комбинации антител WT IgG1-CAMPATH-1H + IgG1-11B8. Таким образом, введение мутаций, которые модулируют взаимодействия Fc-Fc, самоолигомеризацию и связывание с C1q, не повлияло на фармакокинетический профиль антител IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 или их смесей у мышей.

Пример 28: Активация комплемента в жидкой фазе антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8, несущими мутацию, усиливающую

взаимодействие Fc-Fc, мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, и мутации, модулирующие связывание с C1q

После олигомеризации антител фактор комплемента C1 может связываться с мультимерами антител, инициируя дальнейшую активацию каскада комплемента. После активации классического пути комплемента активированный C1s расщепляет C4 на фрагменты C4a и C4b, которые далее процессируются фактором I в C4d. Следовательно, сывороточная концентрация C4d может использоваться как мера активации классического пути комплемента. В данном случае концентрации C4d в сыворотке измеряли после инкубации антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и анти-CD20 антител IgG1-11B8 в сыворотке человека с интактным комплементом (не инактивированным нагреванием), чтобы определить, может ли введение мутаций, усиливающих Fc- Fc- взаимодействия, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q, индуцируют активацию классического пути комплемента, независимо от связывания с мишенью.

Отдельные антитела смешивали с 90% нормальной человеческой сывороткой АВ (NHS) до конечной общей концентрации рекомбинантного IgG 100 мкг/мл. Потом антитела инкубировали в течение 60 мин при 37°C и в дальнейшем хранили на льду. Затем образцы разводили в 100 раз, используя разбавитель для образцов (от Quidel, набор MicroVue Complement C4d Fragment EIA). В соответствии с инструкциями производителя образцы и стандарты, предоставленные в наборе, наносили на 96-луночный микротитровальный планшет, который предварительно обрабатывали 3 стадиями промывки планшета с использованием 250–300 мкл промывочного буфера и промоканием после каждой стадии. Планшеты инкубировали 30 минут при комнатной температуре на шейкере. Затем планшеты для микротитрования опустошали и промывали 5 раз промывочным буфером и промокали насухо после каждой стадии. На лунку добавляли 50 мкл конъюгата C4d из комплекта и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Снова все лунки промывали 5 раз промывочным буфером и промокали насухо после каждой стадии. Затем на лунку добавляли 100 мкл субстрата из набора и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Чтобы остановить ферментативную реакцию, 50 мкл стоп-раствора из комплекта добавляли во все лунки и определяли оптическую плотность при длине волны 405 нм с использованием считывающего устройства для ELISA (Biotek, Уинуски, Вермонт). В сыворотке, использованной для этих анализов, были обнаружены фоновые уровни C4d приблизительно от 11 до 13 мкг/мл. Поэтому два образца, не содержащие антител, использовали в качестве отрицательного контроля, и среднюю концентрацию C4d,

измеренную в этих образцах, вычитали из концентраций C4d, измеренных в образцах, инкубированных с антительными вариантами. Средние выборки и стандартные отклонения были рассчитаны по всем значениям, зарегистрированным в трех независимых экспериментах.

Активация комплемента, определяемая концентрациями C4d в сыворотке, была обнаружена для антительных вариантов, содержащих мутации E345R, E430G, S440Y (RGY) (Фигура 26). Наибольшая активация комплемента была обнаружена при инкубации рекомбинантного Her2ECDHis (SEQ ID NO: 159) и варианта Her2-специфического антитела IgG1-1014-005-E345R-E430G-S440Y (IgG1-1014-005-RGY; SEQ ID NO: 158) в то время как рекомбинантный Her2ECDHis не индуцировал активацию комплемента. Концентрации C4d, значительно отличающиеся от фоновых уровней C4d, не были обнаружены ни для одного из антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-11B8 или IgG1-b12, или их смесей.

В заключение необходимо отметить, что введение мутации E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, мутации K439E или S440K, ингибирующей самоолигомеризацию, и мутации, G236R, G237A, G237Q или G237R, модулирующей связывание с C1q, в антительных вариантах IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-11B8 или IgG -b12 не приводило к активации комплемента в растворе.

Пример 29: Связывание C1q на клетках антительными вариантами, содержащими мутации E430G и K439E или S440K

Для анализа связывания с C1q с клетками Wien 133, инкубированными с антительными вариантами анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и антительными вариантами анти-CD20 IgG1-11B8, содержащими мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию или модулируют связывание с C1q, был проведен проточно-цитометрический анализ. На образец $0,1 \times 10^6$ клеток Wien 133 инкубировали в течение 15 минут при 37°C с разведениями антительных вариантов в диапазоне концентраций от 20 до 0,033 мкг/мл с шагом 2,5-кратного разведения. Затем планшеты охлаждали на льду до 0°C в течение 30 мин. Добавляли охлажденную нормальную сыворотку АВ человека (NHS) до конечной концентрации 20% и планшеты инкубировали в течение 10-20 минут на льду при 0°C . Клетки дважды промывали ледяным буфером для FACS (PBS + 0,1% BSA + 0,02% NaN₃) и затем инкубировали с 20 мкг/мл кроличьего антитела против C1q-FITC человека (Dako; кат. № F0254) в течение 30 минут при 4°C . После двукратной промывки клеток в буфере FACS клетки суспендировали в 30 мкл буфера FACS и анализировали на проточном цитометре iQue (Intellicyt). Связывание C1q, измеренное как среднее значение интенсивности флуоресценции, было подогнано к

модели логарифмического ответа агониста после логарифмической трансформации оси концентраций и нормализовано относительно среднего MFI лунок, инкубированных без антител (0%), и подогнанного верхнего значения кривой дозы-ответ положительного контроля IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%) с использованием GraphPad Prism версии 8.

Эффективное связывание с C1q наблюдали после инкубации клеток Wien 133 со смесью IgG1-CAMPATH-1H-E430G и IgG1-11B8-E430G (Фигура 27A). C1q-связывающая активность отдельного агента IgG1-CAMPATH-1H-E430G была близка к уровню, индуцированному смесью положительного контроля, тогда как IgG1-11B8-E430G демонстрировал низкую активность по связыванию с отдельным агентом C1q.

Введение ингибирующей самоолигомеризацию мутации K439E в IgG1-CAMPATH-1H-E430G привело к частичному снижению эффективности связывания с C1q, в то время как введение ингибирующей самоолигомеризацию мутации S440K в IgG1-11B8-E430G привело к полной потере C1q-связывание (Фигура 27B). Способность связывать C1q восстанавливалась до промежуточных уровней по сравнению со смесью положительного контроля путем смешивания IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E и IgG1-11B8-E430G-S440K. Умеренное восстановление связывания с C1q отдельного агента было достигнуто путем введения усиливающей связывание с C1q мутации K326A или E333S в IgG1-11B8-E430G-S440K. Смешивание любого из двух последних антительных вариантов с IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E привело к восстановлению связывания с C1q, аналогичному уровню смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + IgG1-11B8-E430G-S440K.

Связывание C1q полностью отменялось введением либо мутации, ингибирующей связывание с C1q, G236R (Фигура 27C) или G237T (Фигура 27D) в IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E. Частичное восстановление связывания с C1q наблюдалось после смешивания IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R с антительными вариантами IgG1-11B8-E430G, несущими одну из мутаций S440K, S440K-K326A или S440K-E333S (Фигура 27C). Частичное восстановление связывания с C1q наблюдалось после смешивания IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R с антительными вариантами IgG1-11B8-E430G, несущими одну из мутаций S440K, S440K-K326A или S440K-E333S (Фигура 27C).

В заключение необходимо отметить, что хотя введение мутаций, ингибирующих самоолигомеризацию, K439E или S440K частично отменяет C1q-связывающую способность антител, несущих усиливающую Fc-Fc мутацию E430G, полной отмены связывания с C1q можно достичь путем введения дополнительных мутаций, ингибирующих связывание с C1q. Связывание C1q восстанавливали до различных уровней путем смешивания антител с комплементарными мутациями K439E и S440K, в

зависимости от модулирующих мутаций C1q, введенных в отдельные антитела.

Пример 30: Влияние мутаций, модулирующих связывание с C1q, на *in vitro* связывание Fc γ R анти-CD52 и анти-CD20 антителами с мутацией, усиливающей гексамеризацию, и мутацией, ингибирующей самоолигомеризацию

С помощью очищенных антител, в анализах ELISA тестировали связывание антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 с мономерным внеклеточным доменом (ECD) Fc γ RIA (FCGR1AECDDHis; SEQ ID NO 149) и с димерными внеклеточными доменами Fc γ RIIA аллотипа 131H (diFCGR2AH-HisBAP; diFCGR2AH-HisBAP; ID NO 150), Fc γ RIIA аллотипа 131R (diFCGR2AR-HisBAP; SEQ ID NO 151), Fc γ RIIB (diFCGR2B-HisBAP; SEQ ID NO 152), Fc γ RIIA аллотипа 158F (diFCGR3AF-HisBAP; SEQ ID NO 153) и Fc γ RIIA (аллотип 153) и Fc γ RIIA diFCGR3AV-HisBAP; SEQ ID NO 154). Для обнаружения связывания с димерными вариантами Fc γ R 96-луночные планшеты Microlon для ELISA (Greiner, Германия) покрывали в течение ночи при 4°C козьим F(ab')₂ против IgG-F(ab')₂ человека (Jackson Laboratory, 109-006-097, 1 мкг/мл) в PBS, промывали и блокировали 200 мкл/лунку PBS/0,2% BSA в течение 1 ч при комнатной температуре (RT). С помощью промывок между инкубациями планшеты последовательно инкубировали со 100 мкл/лунку 20 мкг/мл антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H в PBST/0,2% BSA в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании, 100 мкл/лунку димера, His-меченые, биотинилированные на C-конце варианты Fc γ R ECD (1 мкг/мл) в PBST/0,2% BSA в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании и со 100 мкл/лунку стрептавидин-polyHRP (CLB, M2032, 1: 10.000) в PBST/0,2% BSA в качестве детектирующего антитела в течение 30 мин при комнатной температуре при встряхивании. Проявление окраски проводили в течение около 10 (IIAH, IIAH, IIIAV), 20 (IIAF) или 30 (IIB) минут с 1 мг/мл ABTS (Roche, Мангейм, Германия). Для остановки реакции добавляли 100 мкл/лунку 2% щавелевой кислоты. Поглощение измеряли при 405 нм в считывающем устройстве для микропланшетов (BioTek, Уинуски, Вермонт). Для обнаружения связывания с Fc γ RIa 96-луночные планшеты Microlon для ELISA (Greiner, Германия) покрывали в течение ночи при 4°C FCGR1AECDDHis (1 мкг/мл) в PBS, промывали и блокировали 200 мкл/лунку PBS/0,2% BSA. в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ). С помощью промывок между инкубациями планшеты последовательно инкубировали со 100 мкл/лунку 20 мкг/мл антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H в PBST/0,2% BSA в течение 1 ч при комнатной температуре при встряхивании и 100 мкл/лунку HRP-конъюгированного козьего антитела против легкой цепи каппа человека (1: 5000) в PBST/0,2% BSA в течение 30 минут при комнатной температуре при встряхивании. Проявление окраски выполняли

в течение около 10 минут с использованием ABTS 1 мг/мл (Roche, Мангейм, Германия). Для остановки реакции добавляли 100 мкл/лунку 2% щавелевой кислоты. Поглощение измеряли при 405 нм в считывающем устройстве для микропланшетов (BioTek, Уинуски, Вермонт).

Данные из трех (FcγRI, FcγRIIb, FcγRIIIa) или двух (FcγRIIa) независимых реплик объединяли путем нормализации на каждый планшет относительно фонового сигнала в ELISA (контроль без антитела, 0%) и внутренним стандартом, IgG1-CAMPATH-1H, принятым за 100%, а затем усредняется по всем экспериментам. Ожидается, что мутации, введенные для модуляции связывания с C1q с вариантами антител, также повлияют на связывание FcγR. Оценка связывания антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8 с мутацией E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, мутацией K439E или S440K, ингибирующей самоолигомеризацию, и любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, G236R, G237A, K322A, G237T, G237T, G237T, G237T, G237R или G237A-E333S, с FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa и FcγRIa с помощью ELISA выявило, что введение мутаций G236R, G237A, G237T, G237Q или G237R в IgG1-CAMPATH-1H-E430G сильно супрессировало связывание со всеми протестированными вариантами FcγR (Фигура 28A-F). Низкое остаточное связывание наблюдали для IgG1-CAMPATH-1H-E430G-G237A с FcγRIIb и низкоаффинными рецепторами FcγRIIa и FcγRIIIa. Низкое остаточное связывание с FcγRIa также наблюдалось для вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутациями G236R, G237T, G237Q и G237R. IgG1-11B8 дикого типа и IgG1-11B8-E430G-S440K показали аналогичное прочное связывание со всеми протестированными FcγR, которое подавлялось введением G237A или G237A-E333S в IgG1-11B8-E430G-S440K. Последние два варианта антител показали низкое остаточное связывание с рецепторами FcγRIa, FcγRIIb и низкую аффинность с рецептором FcγRIIa. Введение мутации K322A слегка подавляло связывание IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E со всеми протестированными FcγR.

В заключение, связывание FcγR сильно ингибировалось введением мутаций, модулирующих связывание с C1q, G236R, G237A, G237T, G237Q и G237R, в IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E. Точно так же введение мутации G237A или G237A-E333S в IgG1-11B8-E430G-S440K сильно подавляло связывание FcγR.

Точно так же введение мутации G237A или G237A-E333S в IgG1-11B8-E430G-S440K сильно подавляло связывание FcγR.

Подобно IgG1-CAMPATH-1H, гуманизированное антитело IgG1-h2E8 нацелено на CD52 человека. В данном случае влияние на эффективность CDC введения C1q-модулирующих мутаций в антительные варианты IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-h2E8, IgG1-

11B8, несущие мутацию, усиливающую взаимодействие Fc-Fc, и мутацию, ингибирующую самоолигомеризацию, изучали с использованием клеток лимфомы Wien 133.

Различные мутации были введены в антитела IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-h2E8, IgG1-11B8 и IgG1-b12: E430G, которые индуцируют усиленные взаимодействия Fc-Fc; либо мутации K439E, либо S440K, которые ингибируют образование комплексов гомогексамерных антител посредством ингибирования межмолекулярных взаимодействий Fc-Fc и способствуют образованию комплексов гетерогексамерных антител посредством перекрестно комплементарных взаимодействий Fc-Fc; G236R, G237A, G237R, G237T или G237Q, которые супрессируют связывание с C1q с гетерогексамерным комплексом антител и супрессируют связывание с рецепторами Fcγ. В качестве контролей отдельные антитела также смешивали в соотношении 1: 1 с несвязывающим изотипическим контрольным антителом IgG1-b12 или с IgG1-b12-E430G-S440K для прямого сравнения концентраций индивидуальных компонентов и смесей, состоящих из них. Диапазон концентраций очищенных антител (диапазон конечных концентраций 0,009-40,0 мкг/мл; 3,3-кратные разведения) тестировали в анализе CDC *in vitro* на клетках Wien 133 с 20% NHS, по существу, как описано в Примере 2. Процент лизиса клеток рассчитывали как (количество PI-положительных клеток/общее количество клеток) × 100%. Данные анализировали с использованием наиболее подходящих значений модели нелинейного ответа на агонист с использованием логарифмически преобразованных концентраций в GraphPad PRISM и рассчитывали площадь под кривыми доза-ответ для трех экспериментальных повторов. Значения относительных площадей под кривой (AUC) представляют собой нормализацию к минимальному лизису (0% с IgG1-b12) и максимальному лизису (100% со смесью IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G).

Промежуточная эффективность CDC отдельного агента, индуцированная IgG1-11B8-E430G, была отменена введением мутации S440K или двойной мутации S440K-G237A (Фигура 29A). По сравнению с IgG1-11B8-E430G, более высокая эффективность CDC отдельного агента была индуцирована IgG1-CAMPATH-1H-E430G, который можно было полностью аннулировать путем введения мутации K439E-G236R. Эффективность CDC может быть частично восстановлена путем смешивания IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R с IgG1-11B8-E430G-S440K около до 80% эффективности (относительной AUC) смеси положительного контроля IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G.

Подобно IgG1-CAMPATH-1H дикого типа, IgG1-h2E8 дикого типа индуцировал CDC в клетках Wien 133 с промежуточной эффективностью, которая могла быть усилена

введением мутации E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, до того же уровня, что и индуцированное IgG1-CAMPATH-1H-E430G. Смешивание IgG1-h2E8-E430G с IgG1-11B8-E430G индуцировало CDC с эффективностью, сравнимой со смесью IgG1-CAMPATH-1H-E430G и IgG1-11B8-E430G. CDC-активность отдельного агента IgG1-h2E8-E430G может быть частично подавлена введением мутации K439E, ингибирующей самоолигомеризацию. Максимальный лизис, индуцированный отдельным агентом IgG1-h2E8-E430G-K439E при 40 мкг/мл, был близок к уровню смеси IgG1-h2E8-E430G + IgG1-11B8-E430G (Фигура 29B). Эффективность CDC восстанавливалась путем смешивания IgG1-h2E8-E430G-K439E с IgG1-11B8-E430G-S440K (восстановление около до 90% эффективности смеси положительного контроля IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G), но не смешиванием с несвязывающим антигеном IgG1-b12-E430G-S440K. Введение мутации G237A в IgG1-11B8-E430G-S440K в последней смеси не повлияло на эффективность CDC смеси, измеренную как AUC или как максимальный лизис при 40 мкг/мл (Фигура 29B).

Введение мутации G236R в IgG1-h2E8-E430G-K439E полностью аннулировало остаточную активность CDC отдельного агента, в то время как приблизительно 79% активности CDC по сравнению с контрольной смесью можно было восстановить путем смешивания с IgG1-11B8-E430G-S440K. Введение мутации G237A в IgG1-11B8-E430G-S440K слегка подавляло эффективность CDC, восстановленную после смешивания с IgG1-h2E8-E430G-K439E-G236R. Введение мутации G237T в IgG1-h2E8-E430G-K439E подавляло, но не отменяло полностью эффективность CDC отдельного агента. Подобно смеси антительных вариантов IgG1-h2E8-E430G-K439E-G236R и IgG1-11B8-E430G-S440K, эффективность CDC IgG1-h2E8-E430G-K439E-G237T может быть восстановлена путем смешивания с IgG1-11B8-E430G-S430G до около 88% эффективности контрольной смеси или с IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A (около до 79%). Подобно введению мутации G236R, введение G237Q в IgG1-h2E8-E430G-K439E полностью аннулировало остаточную активность CDC отдельного агента. Эффективность CDC может быть восстановлена около до 84% эффективности контрольной смеси путем смешивания с IgG1-11B8-E430G-S440K. Введение мутации G237A в IgG1-11B8-E430G-S440K в последней смеси индуцировало умеренное подавление эффективности CDC около до 74% эффективности контрольной смеси. Максимальный лизис, индуцированный при 40 мкг/мл всеми смесями антител из антительных вариантов IgG1-h2E8-E430G-K439E с любой из модулирующих связывание с C1q мутаций G236R, G237T или G237Q, а также IgG1-11B8-E430G-S440K или IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A было сравнимо с максимальным лизисом, индуцированным смесью IgG1-h2E8-E430G-K439E и IgG1-11B8-E430G-S440K (Фигура

29B).

В заключение необходимо отметить, что варианты анти-CD52 антитела IgG1-h2E8, несущие мутацию E430G, мутацию, ингибирующую самоолигомеризацию, K439E и мутацию, модулирующую связывание с C1q, показали сравнимую селективную взаимозависимую эффективность CDC в клетках Wien 133, как и антительные варианты IgG1-CAMPATH-1H, несущие те же мутации, при смешивании с антительными вариантами анти-CD20 IgG1-11B8, показывая, что эффекты, вызванные наблюдаемыми мутациями, не были специфичными для IgG1-CAMPATH-1H, но были также применимы к другим антителам, нацеленным на CD52.

Пример 32: Рекрутирование, независимое от связывания мишени, антительных вариантов, содержащих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q

В предыдущих примерах было продемонстрировано, что активность CDC отдельного агента вариантов антигенсвязывающего антитела, несущих мутацию, усиливающую взаимодействие Fc-Fc, и мутацию, ингибирующую самоолигомеризацию, может быть дополнительно снижена путем введения мутаций, ингибирующих связывание с C1q. Восстановление эффективности CDC наблюдали после смешивания антительных вариантов со сниженной активностью отдельного агента с комплементарными вариантами антигенсвязывающих антител, несущих мутации, модулирующие связывание с C1q. Здесь мы проверили, можно ли индуцировать совместную гексамеризацию и CDC путем смешивания антигенсвязывающих антительных вариантов с несвязывающими вариантами антител, несущими указанные мутации.

Различные мутации были введены в анти-CD52 антитело IgG1-CAMPATH-1H, анти-CD20 антитело IgG1-11B8 и несвязывающее контрольное антитело IgG1-b12: E430G, которое индуцирует усиленные взаимодействия Fc-Fc; либо мутации K439E, либо S440K, которые ингибируют образование комплексов гомогексамерных антител посредством ингибирования межмолекулярных взаимодействий Fc-Fc и способствуют образованию гетерогексамерных комплексов антител посредством перекрестно комплементарных взаимодействий Fc-Fc; G236R или G237A, которые супрессируют связывание C1q с гетерогексамерным комплексом антител. Диапазон концентраций очищенных антител (диапазон конечных концентраций 0,009-40,0 мкг/мл; 3,3-кратные разведения) тестировали в анализе CDC *in vitro* на клетках Wien 133 с 20% NHS, по существу, как описано в Примере 2. Процент лизиса клеток рассчитывали как (число PI-положительных клеток/общее количество клеток) x 100%. Данные анализировали с использованием наиболее подходящих значений нелинейной модели доза-ответ агониста с

использованием логарифмически преобразованных концентраций в GraphPad PRISM, и рассчитывали площадь под кривыми доза-ответ для трех экспериментальных повторов. Значения относительных площадей под кривой (AUC) представляют собой значения, нормализованные к значению AUC, наблюдаемому для изотипического контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и значению AUC смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

На Фигуре 30А,В показано, что для смеси антительных вариантов несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12, несущего мутацию E430G в комбинации с любой из мутаций K439E или S440K, не наблюдали активности в виде отдельного агента. Кроме того, как описано в предыдущих примерах, не наблюдалось активности в качестве отдельного агента для антител IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R, IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q, IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237R или IgG1-11B8-E430G-S440K. Когда IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237T смешивали с неантигенсвязывающим IgG1-b12-E430G-S440K, CDC детектировалась с 9% эффективностью смеси положительного контроля (IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G). Когда IgG1-11B8-E430G-S440K инкубировали с несвязывающимся IgG1-b12-E430G-K439E, можно было обнаружить умеренный CDC. Напротив, все четыре протестированных варианта CAMPATH могли эффективно восстанавливать CDC при смешивании с антигенсвязывающим CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K.

Потенциальный набор не связанных с клетками антител CD20-направленными вариантами IgG1-11B8 был проанализирован более подробно в отдельных экспериментах путем сравнения эффективности CDC после смешивания с вариантами CD52-связывающего антитела IgG1-CAMPATH-1H или несвязывающим контрольным антителом IgG1-b12, которые оба содержат мутации E430G, K439E и G236R (Фигура 30С, D). Никакой активности в виде отдельного агента не наблюдали для антительных вариантов несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12, несущих мутацию E430G в комбинации с любой из мутаций K439E или S440K и любой из мутаций G236R или G237A. При смешивании двух неантигенсвязывающих антительных вариантов IgG1-b12, оба из которых несут мутацию E430G, либо мутации K439E или S440K, либо мутации G236R или G237A, эффективности CDC не наблюдалось. Частичное восстановление эффективности CDC около до 15% и 19% эффективности CDC смеси положительного контроля наблюдалось после смешивания неантигенсвязывающего антитела IgG1-b12-E430G-K439E-G236R с IgG1-11B8-E430G-S440K или IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A, соответственно. Активность CDC может быть восстановлена около до 65% и 71% от уровня, индуцированного смесью положительного контроля, путем смешивания IgG1-

CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R либо с IgG1-11B8-E430G-S440K, либо с IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A, соответственно. Это восстановление не индуцировалось при смешивании IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R с любым из несвязывающихся с мишенью антител IgG1-b12-E430G-S440K или IgG1-b12-E430G-S440K-G237A.

Эти данные показывают, что варианты антигенсвязывающих антител, несущие мутацию E430G, усиливающую взаимодействие Fc-Fc, мутацию S440K, ингибирующую самоолигомеризацию, и, возможно, мутацию G237A, ингибирующую связывание с C1q, могут рекрутировать несвязывающие антиген антительные варианты, несущие комплементарные мутации E430G, K439E и G236R, в конечном итоге приводя к индукции CDC. Независимое от связывания антигена рекрутирование комплементарного антитела E430G-S440K было сильно супрессировано, если связывающее антиген антитело содержало помимо E430G-K439E также любую из мутаций, ингибирующих связывание с C1q, G236R, G237Q или G237R, тогда как G237T не блокировала независимое от связывания антигена рекрутирование комплементарного антитела.

Пример 33: Способность активировать FcγRIIa и FcγRIIIa антительными вариантами, несущими мутации, которые усиливают взаимодействие Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q

В Примере 31 исследовали связывание антительных вариантов, несущих мутацию E430G, усиливающую взаимодействие Fc-Fc, либо мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, либо мутации, модулирующих связывание с C1q, G236R, G237A, G237T, G237Q, G237R или K322a, с FcγRIA, FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIIIa. Введение мутаций, модулирующих связывание с C1q, в положения G236 или G237 приводило к супрессии связывания FcγR. Здесь мы изучили, влияет ли введение C1q-связывающих модулирующих мутаций G236R, G237A, G237A-E333S или G237Q в анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E и анти-CD20 IgG1-11B8-E430G-S440K на индукцию ADCC путем определения опосредованной FcγRIIa и FcγRIIIa активации в репортерном анализе Promega с использованием экспрессирующих мишень клеток Raji и линии репортерных клеток Jurkat, экспрессирующих высокоаффинные аллотипические варианты человеческого FcγRIIa или человеческого FcγRIIIa.

Активация FcγR-опосредованной передачи сигналов антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8, упомянутыми выше, была количественно определена с помощью репортерного теста ADCC Reporter BioAssays (Promega, FcγRIIa: кат. № G9995; FcγRIIIa: кат. № G7018) на клетках Raji, в соответствии с рекомендациями производителя. В качестве эффекторных клеток набор содержит Т-клетки человека Jurkat, которые сконструированы для стабильной экспрессии высокоаффинного FcγRIIa (FcγRII-H) или

Fc γ RIIIa (V158) и респонсивного элемента с ядерным фактором активированных Т-клеток (NFAT), управляющего экспрессией люциферазы светлячка. Вкратце, клетки Raji (5.000 клеток/лунку) высевали в 384-луночные белые планшеты OptiPlates (Perkin Elmer кат. № 6007290) в буфере для анализа ADCC (Promega, кат. № G719A) с добавлением 12% сыворотки с низким содержанием IgG (Promega; кат. № G711A) и инкубировали в течение 6 часов при 37°C/5% CO₂ в общем объеме 30 μ л, содержащем серии концентраций антител (конечные концентрации 0,0002-40 мкг/мл в 4-кратных разведениях) и размороженные эффекторные клетки ADCC Bioassay. После инкубации планшетов в течение 15 минут при комнатной температуре (RT) добавляли 30 μ л люциферазного реагента Bio Glo Assay и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Выработку люциферазы количественно определяли считыванием люминесценции на считывающем устройстве EnVision Multilabel Reader (Perkin Elmer). Сигналы люминесценции нормализовали путем вычитания из фонового сигнала люминесценции, определенного только для образцов среды (без клеток Raji, без антител, без эффекторных клеток). Данные анализировали с использованием наиболее подходящих значений нелинейной модели доза-ответ агониста с использованием логарифмически преобразованных концентраций в GraphPad PRISM и рассчитана площадь под кривыми доза-ответ трех (Fc γ RIIIa) или двух (Fc γ RIIIa) экспериментальных повторов. Значения AUC были нормализованы для каждого эксперимента относительно репортерной активности, наблюдаемой для клеток, инкубированных с несвязывающимся контролем IgG1-b12 (0%), и активности смеси IgG1-Campath-1H дикого типа + IgG1-11B8 дикого типа (100%), а затем усреднены по экспериментальным повторам.

В качестве отдельного агента антительный вариант IgG1-11B8-E430G-S440K индуцировал активацию, опосредованную Fc γ RIIIa (Фигура 31A), что соответствует результатам в примере 31, показывающим связывание Fc γ RIIIa этим вариантом. Напротив, Fc γ RIIIa-опосредованная активация антительными вариантами в виде отдельного агента не наблюдалась при введении C1q-связывающих модулирующих мутаций G236R или G237Q в IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E или мутаций G237A или G237A-E333S в IgG1-11B8-E430G-S440K. Также смеси вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, несущих мутацию G236R или G237Q, и вариантов IgG1-11B8-E430G-S440K, несущих мутации G237A или G237A-E333S, не индуцировали Fc γ RIIIa-опосредованную активацию. Однако смесь IgG1-11B8-E430G-S440K и либо IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R, либо IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q действительно индуцировала Fc γ RIIIa-опосредованную активацию. Те же антительные варианты были протестированы на способность индуцировать Fc γ RIIIa-опосредованную активацию (Фигура 31B). В данном

случае Fc γ RIIIa-опосредованная активация наблюдалась только с помощью IgG1-11B8-E430G-S440K или при смешивании с вариантами IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, несущими мутацию G236R или G237Q. IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E с мутацией G236R или без нее, индуцировал низкую или промежуточную Fc γ RIIIa-опосредованную активацию, соответственно. Когда IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R или IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q были смешаны с одним из вариантов IgG1-11B8-E430G-S440K G237A или G237A-E333S, Fc γ RIIIa-опосредованная активация не обнаруживалась.

В заключение следует отметить, что способность индуцировать Fc γ RIIIa- или Fc γ RIIIa-опосредованную активацию, используемую в качестве суррогатной меры для ADCC, антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8, несущими мутацию, усиливающую взаимодействие Fc-Fc и ингибирующую самоолигомеризацию, эффективно отменяется введением мутаций, модулирующих связывание с C1q, G236R, G237A, G237A-E333S или G237Q.

Пример 34: Селективность CDC-активности на клетках Wien 133 после титрования компонентов смеси антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H и антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8 с мутациями, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют C1q-связывание

В предыдущих примерах антительные варианты, содержащие мутацию, усиливающую взаимодействия Fc-Fc, а также мутацию, которая ингибирует самоолигомеризацию, и мутацию, которая модулирует связывание с C1q, были смешаны в соотношении 1: 1. Здесь мы проверили, достигается ли также селективная взаимозависимая активность CDC путем смешивания двух антительных вариантов в неэквиволярных соотношениях.

Анализ CDC *in vitro* с использованием клеток Wien 133 проводили с 20% NHS, по существу, как описано в Примере 2. Одиночные антитела титровали в 3,3-кратных разведениях (диапазон конечных концентраций 0,005-20,0 мкг/мл). При применении смесей антител один компонент титровали (диапазон конечной концентрации 0,0003-20,0 мкг/мл в 5-кратных разведениях), а другой компонент использовали при фиксированной концентрации 20 мкг/мл. Лизис клеток рассчитывали по количеству PI-положительных клеток, как описано в Примере 2.

Эффективную активность CDC на клетках Wien 133 индуцировали титрованной смесью (соотношение 1:1) IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R и IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A (Фигура 32A). CDC индуцировалась еще более эффективно при

инкубации клеток Wien 133 со смесью антительных вариантов, в которой один антительный вариант был титрован, а другой антительный вариант применялся в фиксированной концентрации 20 мкг/мл. При смешивании титрованного IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R с 20 мкг/мл несвязывающего мишень антитела IgG1-b12 или его варианта, несущего мутации E430G-S440K-G237A, активность CDC не обнаруживалась, что указывает на то, что гетерогексамеризация оставалась зависимой от связывания мишени даже при концентрациях IgG, насыщающих связывание CD20. Также не наблюдалась CDC при смешивании IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R и IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A в отсутствие сыворотки, что указывает на необходимость C1q для стабилизации гексамерного комплекса. Очень похожие результаты были получены для смесей IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q и IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A (Фигура 32B). CDC индуцировался только смесями IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q и IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A, в смесях, в которых титровали оба варианта антител, или в смесях, в которых титровали один вариант антитела и другие антительные варианты применяли в фиксированной концентрации 20 мкг/мл. Смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q и не связывающегося с мишенью антитела IgG1-b12 или его варианта, несущего мутации E430G-S440K-G237A, не индуцировали CDC.

В заключение необходимо отметить, что эффективная CDC на клетках Wien 133 может быть индуцирована совместно антительными вариантами IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8, несущими мутацию E430G, усиливающую взаимодействие Fc-Fc, либо мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, либо любая из модулирующих связывание с C1q мутаций G236R, G237A или G237Q в широком диапазоне неэквимолярных соотношений: > 50% лизис наблюдалась при соотношении CAMPATH: 11B8 в диапазоне от 100: 3 до 1: 100, при условии, что связывание, по меньшей мере, с одной из мишеней было насыщено.

Пример 35: Селективность антительных вариантов к CD52 и HLA-DR, содержащих мутацию, усиливающую взаимодействие Fc-Fc, E430G, либо мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, либо мутации, модулирующей связывание с C1q, P329R или G236R

Здесь на клетках лимфомы Oci-Ly17 изучали селективную взаимозависимую эффективность CDC с помощью антительных вариантов против CD52 и против HLA-DR, содержащих мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, и мутации, модулирующие связывание с C1q.

Различные мутации были введены в анти-CD52 антитела IgG1-CAMPATH-1H и анти-HLA-DR антитела IgG1-HLA-DR-huL243 и IgG1-HLA-DR-1D09C3: E430G, которые

индуцируют усиленные взаимодействия Fc-Fc, либо ингибирующие самоолигомеризацию мутации K439E или S440K, а также мутации G236 или P329R, которые супрессируют связывание с C1q. В качестве контролей отдельные антитела также смешивали в соотношении 1: 1 с изотипными контрольными антителами IgG1-b12 или IgG1-b12-E430G-S440K, чтобы обеспечить прямое сравнение концентраций индивидуальных компонентов и смесей, состоящих из них. Диапазон концентраций очищенных антител (диапазон конечных концентраций 0,009-40,0 мкг/мл; 3,3-кратные разведения) был протестирован в анализе CDC *in vitro* на 30000 клеток лимфомы Osi-Ly17 на состояние с 20% NHS, по существу, как описано далее в Пример 2. Процент лизиса клеток рассчитывали как (количество PI-положительных клеток/общее количество клеток) x 100%. Данные анализировали с использованием наиболее подходящих значений нелинейной модели доза-ответ агониста с использованием логарифмически преобразованных концентраций в GraphPad PRISM, и рассчитывали площадь под кривыми доза-ответ для трех экспериментальных повторов. Значения относительной площади под кривой (AUC) представляют собой нормализацию к минимальному лизису (0% с IgG1-b12) и максимальному лизису (100% со смесью IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-HLA-DR-huL243-E430G на Фигуре 33А; или 100% со смесью IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-HLA-DR-1D09C3-E430G на Фигуре 33В).

Смесь IgG1-CAMPATH-1H-E430G и IgG1-HLA-DR-huL243-E430G индуцировала эффективную CDC клеток Osi-Ly17 (смесь положительного контроля; принято за 100%, Фигура 33А). Отдельные агенты последней смеси индуцировали CDC около до 83% (IgG1-CAMPATH-1H-E430G) и 80% (IgG1-HLA-DR-huL243-E430G) эффективности смеси положительного контроля. Введение мутации S440K в IgG1-CAMPATH-1H-E430G снижает способность индуцировать CDC около до 24% от эффективности контрольной смеси, в то время как введение двойной мутации K439E-P329R в IgG1-HLA-DR-huL243-E430G снижает способность вызвать CDC около до 8,5% эффективности контрольной смеси. Путем смешивания IgG1-HLA-DR-huL243-E430G-K439E-P329R и IgG1-CAMPATH-1H-E430G-S440K способность индуцировать CDC восстанавливалась до около 38% эффективности контрольной смеси. Эффективность CDC в виде отдельного агента для IgG1-HLA-DR-huL243-E430G была аннулирована введением двойной мутации K439E-G236R. Восстановление эффективности CDC может быть достигнуто путем смешивания IgG1-HLA-DR-huL243-E430G-K439E-G236R с IgG1-CAMPATH-1H-E430G-S440K около до 75% эффективности контрольной смеси, но не с антительным вариантом, не связывающимся с мишенью IgG1-b12-E430G-S440K.

Сопоставимые результаты наблюдались при тестировании антительных вариантов

анти-HLA-DR IgG1-HLA-DR-1D09C3 вместо IgG1-HLA-DR-huL243 (Фигура 33B). Смесь IgG1-CAMPATH-1H-E430G и IgG1-HLA-DR-1D09C3-E430G индуцировала эффективную CDC клеток Oci-Ly17 (смесь положительного контроля; принято за 100%, Фигура 33B). Отдельные агенты последней смеси индуцировали CDC около до 70% (IgG1-CAMPATH-1H-E430G) и 95% (IgG1-HLA-DR-1D09C3-E430G) эффективности контрольной смеси. Введение мутации S440K в IgG1-CAMPATH-1H-E430G снижает способность индуцировать CDC около до 20% от эффективности контрольной смеси, в то время как введение двойной мутации K439E-P329R в IgG1-HLA-DR-1D09C3-E430G снижает способность индуцировать CDC около до 7% эффективности контрольной смеси. Путем смешивания IgG1-HLA-DR-huL243-E430G-K439E-P329R и IgG1-CAMPATH-1H-E430G-S440K способность индуцировать CDC восстанавливалась около до 35% от уровня, индуцированного эффективностью контрольной смеси. Эффективность CDC в виде отдельного агента для IgG1-HLA-DR-1D09C3-E430G была аннулирована введением двойной мутации K439E-G236R. Восстановление эффективности CDC может быть достигнуто путем смешивания IgG1-HLA-DR-1D09C3-E430G-K439E-G236R с IgG1-CAMPATH-1H-E430G-S440K около до 50% эффективности контрольной смеси, но не с антительным вариантом, не связывающимся с мишенью IgG1-b12-E430G-S440K.

В заключение, эти данные показывают, что селективная, взаимозависимая CDC клеток лимфомы Oci-Ly17 может быть индуцирована путем смешивания антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H с антительными вариантами любого анти-HLA-DR IgG1-HLA-DR-huL243 или IgG1-HLA-DR-1D09C3 путем введения мутации E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, мутаций K439E или S440K, ингибирующих самоолигомеризацию, и мутаций, ингибирующих связывание с C1q, P329R или G236R.

Пример 36: Селективность антительных вариантов, содержащих мутации в положении L234 и L235, которые супрессируют связывание Fc γ R и связывание с C1q.

В примерах 5 и 12 описано влияние на эффективность CDC при введении мутаций, которые модулируют связывание с C1q в антительных вариантах. Введение мутаций G236R и G237Q в IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E привело к анулированию активности CDC отдельного агента на клетках Wien 133. Здесь влияние на эффективность CDC в отношении клеток Wien 133 было изучено для антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E и IgG1-11B8-E430G-S440K после введения модулирующих связывание с C1q мутаций в положения L234 и L235.

В антитела IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8: E430G, были введены различные мутации, которые индуцируют усиленные взаимодействия Fc-Fc; либо мутации,

ингибирующей самоолигомеризацию, K439E или S440K; и L234A, L234A-L235A, L234F, L234F-L235E, L235A, L235Q, G236R или G237Q, которые супрессируют связывание C1q с гетерогексамерным антительным комплексом. В качестве контролей отдельные антитела также смешивали в соотношении 1: 1 с несвязывающими изотипными контрольными антителами IgG1-b12, чтобы обеспечить прямое сравнение концентраций индивидуальных компонентов и смесей, состоящих из них. Здесь неочищенные надосадочные жидкости из транзитивно трансфицированных EXPI293 использовали в качестве источника IgG для вариантов IgG1-CAMPATH-1H, содержащих замены в L234, L235 или их комбинации. Диапазон концентраций антител (диапазон конечных концентраций 0,009-40,0 мкг/мл; 3,3-кратные разведения) тестировали в анализе CDC *in vitro* на клетках Wien 133 с 20% NHS, по существу, как описано в Примере 2. Процент лизиса клеток рассчитывали как (количество PI-положительных клеток/общее количество клеток) x 100%. Данные анализировали с использованием наиболее подходящих значений нелинейной модели доза-ответ агониста с использованием логарифмически преобразованных концентраций в GraphPad PRISM, и рассчитывали площадь под кривыми доза-ответ для трех экспериментальных повторов. Значения относительных площадей под кривой (AUC) представляют собой нормализацию к минимальному лизису (0% с IgG1-b12) и максимальному лизису (100% со смесью IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G).

Надосадочная жидкость ложно-трансфицированных EXPI293 не индуцировала лизис клеток Wien 133, что исключает влияние веществ в использованных неочищенных надосадочных жидкостях. Надосадочная жидкость ложно-трансфицированных EXPI293 не индуцировала лизис клеток Wien 133, что исключает влияние веществ в использованных неочищенных надосадочных жидкостях. Для всех этих антительных вариантов эффективность CDC может быть частично восстановлена при смешивании с IgG1-11B8-E430G-S440K. Эффективность восстановления CDC варьировала от около 70% (IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R + IgG1-11B8-E430G-S440K) до около 84% (IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-L234F + IgG1-11B8-E430G-S440K) эффективности, определяемой AUC смеси положительного контроля IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G.

В заключение, активность отдельного агента IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E в клетках Wien 133 может быть отменена путем введения мутаций, ингибирующих связывание с C1q, L234A, L234A-L235A, L234F, L234F-L235E, L235A и L235Q, сравнимых с эффектами введения мутаций G236R или G237Q. Восстановление эффективности CDC может быть достигнуто путем смешивания этих антительных

вариантов с IgG1-11B8-E430G-S440K. Таким образом, было замечено, что любая из замен, ингибирующих связывание с C1q, протестированных в предыдущих примерах и в этом примере, может улучшить селективность созависимо действующих антител по настоящему изобретению. В этой большой группе замены G236K/R, G237, L234 и L235 являются предпочтительными заменами, поскольку они относительно слабо модулируют связывание с C1q, одновременно ингибируя опосредованные FcγR эффекторные функции. Не ограничиваясь какой-либо теорией, считаем, что это может позволить восстановить сильную зависимость от олигомеризации активность, такую как CDC, если гетерогексамерный комплекс, образованный между двумя антителами по настоящему изобретению на клетках, связанных с обоими антителами, имеет достаточную avidность связывания с C1q, тем самым избирательно проявляя максимальную активность в отношении клеток, связанных обоими антителами.

Пример 37: Селективность антительных вариантов с альтернативными мутациями, усиливающими взаимодействие Fc-Fc в положениях E345 и E430, в дополнение к мутациям, которые ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q

В предыдущих примерах мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc E345K, E345R и E430G, были введены в взаимозависимые антительные варианты. Здесь мы изучали, приводит ли введение альтернативных замен в положениях E430 и E345 в антительные варианты IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8, несущие мутации, которые ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q, к взаимозависимой индукции CDC на клетках Wien 133.

Различные мутации были введены в антитела IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8. Замены E430, E430G, E430N, E430T, E430V и E430Y, были выбраны для представления совершенно разных замен, таких как небольшие, гидрофильные, гидрофобные и большие/ароматические мутации. Аналогичным образом, мутации E345A, E345K, E345Q, E345R, E345V, E345Y, введенные в E345, были выбраны для представления малых, основных/заряженных, гидрофильных, гидрофобных и больших/ароматических мутаций. Ранее предполагалось, что комбинация мутации K248E-T437R модулирует олигомеризацию IgG посредством взаимодействий Fc-Fc (WO2018031258). Кроме того, антитела содержали либо мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, либо мутации, модулирующие C1q, G236R, G237A или E333S. В качестве контролей отдельные антитела также смешивали в соотношении 1: 1 с несвязывающими изотипными контрольными антителами IgG1-b12, чтобы обеспечить прямое сравнение концентраций индивидуальных компонентов и смесей, состоящих из них. Здесь

неочищенные надосадочные жидкости транзиторно трансфицированных EXPI293 использовали в качестве источника IgG для антительных вариантов, которые не содержали замены E430G, E345K или E345R. Диапазон концентраций антител (диапазон конечных концентраций 0,009-40,0 мкг/мл; 3,3-кратные разведения) тестировали в анализе CDC *in vitro* на клетках Wien 133 с 20% NHS, по существу, как описано в Примере 2. Процент лизиса клеток рассчитывали как (количество PI-положительных клеток/общее количество клеток) \times 100%. Данные анализировали с использованием наиболее подходящих значений нелинейной модели доза-ответ агониста с использованием логарифмически преобразованных концентраций в GraphPad PRISM, и рассчитывали площадь под кривыми доза-ответ для двух экспериментальных повторов. Активность/эффективность CDC, представленные в виде относительных площадей под кривой (AUC), представляют собой значения, нормализованные на планшет относительно минимального лизиса (0% для IgG1-b12) и максимального лизиса (100% для смеси IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G), которые впоследствии были усреднены по двум независимым экспериментальным повторам.

Надосадочная жидкость ложно-трансфицированных EXPI293 не индуцировала лизис клеток Wien 133, что исключает влияние веществ в использованных неочищенных надосадочных жидкостях. Как описано в предыдущих примерах, введение мутаций E430G-S440K или E430G-S440K-G237A в IgG1-11B8 аннулировало эффективность CDC отдельного агента (Фигура 35A), в то время как активность CDC отдельного агента IgG1-CAMPATH-1H могла быть отменена введением мутаций E430G-K439E-G236R. Эффективность CDC восстанавливалась путем смешивания IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R с антительными вариантами IgG1-11B8 либо с мутациями E430G-S440K, либо с мутациями E430G-S440K-G237A до около 82% и 91%, соответственно, от измеренной активности для смеси положительного контроля IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G.

Когда любую из мутаций E430N (которая приводит к SEQ ID NO 115), E430T (которая приводит к SEQ ID NO 117), E430V (которая приводит к SEQ ID NO 119), E345A (которая приводит к SEQ ID NO 64), E345K (которая приводит к SEQ ID NO 66), E345Q (что дает SEQ ID NO 69), E345R (дает SEQ ID NO 73) или E345Y (дает SEQ ID NO 77) вводили в IgG1-CAMPATH-1H-K439E-G236R вместо E430G, были достигнуты результаты, сравнимые с результатами, наблюдаемыми для E430G: активность CDC в виде отдельного агента для антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H, несущих любую из упомянутых замен E430, была на фоновом уровне, в то время как восстановление активности CDC достигалось путем смешивания вариантов IgG1-CAMPATH-1H с IgG1-

11B8-E430G-S440K или IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A. Восстановление эффективности CDC с помощью смесей варьировало от около 78% (IgG1-CAMPATH-1H-E345Q-K439E-G236R + IgG1-11B8-E430G-S440K) до около 92% (IgG1-CAMPATH-1H-E345R-K439E-G236R + IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A) эффективности контрольной смеси. Антительный вариант IgG1-CAMPATH-1H-E430Y-K439E-G236R (SEQ ID NO 121) индуцировал приблизительно 44% остаточной активности CDC отдельного агента по сравнению с эффективностью контрольной смеси. Эффективность CDC восстанавливалась приблизительно до 94% от уровня, индуцированного смесью положительного контроля, путем смешивания IgG1-CAMPATH-1H-E430Y-K439E-G236R с IgG1-11B8-S440K-G237A.

При замене мутации E430G в IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A любой из мутаций E430N (приводящей к SEQ ID NO 116), E430T (приводящей к SEQ ID NO 118), E430V (приводящей к SEQ ID NO 120), E345A (что дает SEQ ID NO 65), E345Q (дает SEQ ID NO 70), E345V (дает SEQ ID NO 76) или E345Y (дает SEQ ID NO 78), результаты, сравнимые с результатами, наблюдаемыми для E430G: активность CDC отдельного агента антительных вариантов IgG1-11B8, несущих любую из упомянутых замен E430, была на фоновом уровне, в то время как восстановление активности CDC было достигнуто путем смешивания вариантов IgG1-11B8 с IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R (Фигура 35B). Восстановление эффективности CDC с помощью смесей варьировало от около 80% (IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R + IgG1-11B8-E430V-S440K-G237A) до около 86% (IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R + IgG1-11B8-E345Q-S440K-G237A) эффективности контрольной смеси. около 21% остаточной активности CDC отдельного агента от уровня, индуцированного смесью положительного контроля, наблюдали для антительного варианта IgG1-11B8-E430Y-S440K-G237A (SEQ ID NO 122), тогда как эффективность CDC могла быть восстановлена около до 91% от уровня, индуцированного смесью положительного контроля путем смешивания IgG1-11B8-E430Y-S440K-G237A с IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R.

Сильное восстановление эффективности CDC также наблюдалось при смешивании IgG1-CAMPATH-1H-K439E-G236R и антительного варианта IgG1-11B8-S440K-G237A, в котором идентичная мутация, модулирующая взаимодействие Fc-Fc, была введена в оба антитела, выбранных из следующих мутаций: E430N, E430T, E430V, E345A, E345Q, E345V, E345Y (Фигура 35C). Как показано на Фигуре 35A и B, активность отдельного агента этих антительных вариантов была на фоновом уровне. Восстановление эффективности CDC варьировало от около 70% (IgG1-CAMPATH-1H-E430V-K439E-G236R + IgG1-11B8-E430V-S440K-G237A) до около 89% (IgG1-CAMPATH-1H-E430T-

K439E-G236R + IgG1 -11B8-E430T-S440-G237A) уровня, индуцированного смесью положительного контроля. Наибольшее восстановление эффективности CDC было достигнуто смесью антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H-K439E-G236R и IgG1-11B8-S440K-G237A, в которые была введена мутация E430Y (приблизительно 97% от уровня, индуцированного смесью положительного контроля), в то время как оба антительных варианта индуцировали остаточную активность CDC отдельного агента, как описано выше.

Было описано, что введение двойной мутации K248E-T437R в антительные варианты способствует взаимодействию Fc-Fc. Как показано на Фигуре 35D, введение мутации S440K-G237A в IgG1-11B8-K248E-T437R (приводящее к SEQ ID NO 131) аннулировало эффективность CDC отдельного агента на клетках Wien 133. Частичное ингибирование активности CDC отдельного агента наблюдалось при введении мутации S440K-E333S в IgG1-11B8-K248E-T437R (что приводило к SEQ ID NO 130). Сильное восстановление эффективности CDC наблюдалось при смешивании IgG1-11B8-K248E-T437R-S440K-G237A с IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R около до 87% эффективности контрольной смеси. Кроме того, введение мутаций K248E-T437R в антительный вариант IgG1-CAMPATH-1H, который также несет мутации K439E-G236R (приводящие к SEQ ID NO 128), привело к антительному варианту, лишенному какой-либо активности CDC в виде отдельного агента. Эффективность CDC может быть эффективно восстановлена путем смешивания IgG1-CAMPATH-1H-K248E-T437R-K439E-G236R с любым из антительных вариантов IgG1-11B8, содержащих мутации E430G-S440K-G237A, K248E-T437R-S440K-G237A или K248E-T437R-S440K-E333S около до 87%, 84% и 97% эффективности контрольной смеси, соответственно. Аналогичным образом, введение мутаций K248E-T437R в антительный вариант IgG1-CAMPATH-1H, который также несет мутации K439E-G237Q (приводящие к SEQ ID NO 129), привело к антительному варианту, лишенному активности CDC какого-либо отдельного агента. Восстановление эффективности CDC может быть достигнуто путем смешивания IgG1-CAMPATH-1H-K248E-T437R-K439E-G237Q с антительными вариантами IgG1-11B8, несущими мутации K248E-T437R-S440K-G237A или K248E-T437R-S440K-E333, около до 86% и 98% эффективности контрольной смеси, соответственно.

В заключение, селективная взаимозависимая эффективность CDC в отношении клеток Wien 133 может быть достигнута путем смешивания антительных вариантов IgG1-CAMPATH-1H и IgG1-11B8, несущих различные мутации, модулирующие взаимодействие Fc-Fc, включая все протестированные замены E430 (E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y), все протестированные замены E345 (E345A, E345K, E345Q,

E345R, E345V, E345Y) и K248E-T437R, в дополнение к мутациям, которые ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q. Кроме того, взаимозависимая активность наблюдалась, когда смешанные антитела содержали неидентичные мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc.

Таким образом, можно ожидать, что любая замена E430 или любая замена E345 может быть применена во взаимозависимо действующих антителах по изобретению, при условии, что они также содержат мутацию, ингибирующую самоолигомеризацию, K439E или S440K, и при условии, что одно антитело также содержит мутацию, модулирующую связывание с C1q, например, G236R, G237Q или G237A. Замены E430Y и E430F, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, могут быть менее предпочтительными заменами для антител по настоящему изобретению из-за их остаточной активности в виде отдельного агента.

Пример 38: Селективность активности CDC в отношении клеток лимфомы Raji с помощью смесей, состоящих из варианта антитела, несущего мутации E430G-S440K и мутации, ингибирующей связывание с C1q, и варианта антитела, несущего мутации E430G-K439E и мутации, усиливающей связывание с C1q

В предыдущих примерах способность индуцировать CDC была измерена для зависимых смесей, содержащих два антительных варианта, один из которых был вариантом антитела, несущим мутацию, усиливающую взаимодействие Fc-Fc, и мутацию K439E, ингибирующую самоолигомеризацию, в сочетании с мутацией, ингибирующей связывание с C1q, а другой был антительным вариантом, несущим мутацию, усиливающую взаимодействие Fc-Fc, и мутацию, ингибирующую самоолигомеризацию, S440K, необязательно в комбинации с мутацией, усиливающей связывание с C1q. Здесь мы проверили, может ли селективная взаимозависимая индукция CDC на клетках Raji также индуцироваться в обратном направлении, то есть путем смешивания антительных вариантов IgG1-CD37-37-3-E430G-K439E, несущих мягкую мутацию, ингибирующую или усиливающую связывание с C1q, с антительными вариантами IgG1-11B8-E430G-S440K, содержащими мутацию, ингибирующую связывание с C1q.

В антитела IgG1-CD37-37-3 и IgG1-11B8 были введены различные мутации: E430G, которые индуцируют усиленные взаимодействия Fc-Fc; либо мутации K439E, либо S440K, ингибирующей самоолигомеризацию; G236R, G237A, G237Q, которые супрессируют связывание с C1q с комплексом гетерогексамерного антитела; E333S, который усиливает связывание с C1q с гетерогексамерным комплексом антитела. В качестве контролей отдельные антитела также смешивали в соотношении 1: 1 с несвязывающими изотипными контрольными антителами IgG1-b12, чтобы обеспечить

прямое сравнение концентраций индивидуальных компонентов и смесей, состоящих из них. Здесь также неочищенные надосадочные жидкости от транзиторно трансфицированных надосадочных жидкостей EXPI293 использовали в качестве источника IgG. Диапазон концентраций очищенных антител (диапазон конечных концентраций 0,009-40,0 мкг/мл; 3,3-кратные разведения) тестировали в анализе CDC *in vitro* на клетках Wien 133 с 20% NHS, по существу, как описано в Примере 2. Процент лизиса клеток рассчитывали как (количество PI-положительных клеток/общее количество клеток) x 100%. Данные анализировали с использованием наиболее подходящих значений нелинейной подгонки дозозависимого эффекта с использованием логарифмически преобразованных концентраций в GraphPad PRISM и рассчитывали площадь под кривыми доза-ответ для трех экспериментальных повторов. Эффективность CDC, представленная в виде относительных площадей под кривой (AUC), представляет собой значения, нормализованные на планшет относительно минимального лизиса (0% с IgG1-b12) и максимального лизиса (100% для смеси IgG1-CD37-37-3-E430G + IgG1-11B8-E430G), которые впоследствии были усреднены по двум независимым экспериментальным повторам. Смеси положительного контроля IgG1-CD37-37-3-E430G и IgG1-11B8-E430G индуцировали эффективную CDC в клетках Raji (Фигура 36A). Активность отдельного агента для антительных вариантов IgG1-11B8-E430G может быть сильно подавлена путем введения мутации K439E, на которую в дальнейшем не влияет дополнительное введение мутаций, ингибирующих связывание с C1q (G237A) или усиливающих связывание с C1q (E333S). Эффективность CDC также может быть сильно подавлена введением мутации S440K с или без мутации G237A, ингибирующей связывание с C1q. Хотя введение мутаций K439E-G236R в IgG1-CD37-37-3-E430G также отменяет эффективность CDC в виде отдельного агента, эффективность CDC может быть восстановлена путем смешивания IgG1-CD37-37-3-E430G-K439E-G236R с любым IgG1-11B8-E430G-S440K или IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A около до 72% и 62%, соответственно, от уровня, индуцированного смесью положительного контроля. Аналогичным образом, введение мутаций K439E-G237A, K439E-E333S (SEQ ID NO: 82), S440K-G236R (SEQ ID NO: 104), S440K-G237A или S440K-G237Q (SEQ ID NO: 107) в IgG1-CD37-37-3-E430G не демонстрировало активности в виде отдельного агента, в то время как смеси этих антител с антительными вариантами IgG1-11B8, несущими комплементарную мутацию, ингибирующую самоолигомеризацию, и либо мутации, ингибирующие связывание с C1q (G237A), либо мутации, усиливающие связывание с C1q (E333S), частично восстановили эффективность CDC (в диапазоне приблизительно от 43% до 94% эффективности контрольной смеси). Максимальный лизис при концентрации 40 мкг/мл, индуцированный

взаимозависимыми смесями антительных вариантов IgG1-CD37-37-3 и IgG1-11B8, был сильным, в диапазоне от 76% до 93% эффективности контрольной смеси (Фигура 36B).

В заключение необходимо отметить, что в то время как активность CDC отдельного агента для антительных вариантов IgG1-C37-37-3 и IgG1-11B8, несущих мутацию E430G, может быть отменена путем введения либо мутаций K439E, либо S440K, либо любой из мутаций, модулирующих связывание с C1q, G236R, G237A, G237Q, E333S, смеси таких антительных вариантов восстанавливали эффективность CDC независимо от того, какая комбинация мутации, ингибирующей самоолигомеризацию, и мутации, ингибирующей или усиливающей связывание с C1q, была введена в любое из двух антител.

Пример 39: Селективная комплемент-зависимая цитотоксичность клеток CLL пациента за счет взаимозависимых комбинаций вариантов анти-CD52 и анти-CD20 антител, содержащих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q

В предыдущих примерах эффективность CDC комбинаций антительных вариантов тестировалась с использованием линий опухолевых клеток, культивируемых *in vitro*. Здесь селективная взаимозависимая индукция CDC изучалась с использованием опухолевых клеток от пациентов с хроническим лимфатическим лейкозом (CLL) путем смешивания антительных вариантов анти-CD20 IgG1-11B8 и анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H, которые несут мутацию, усиливающую взаимодействие Fc-Fc, E430G, либо мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, либо мутации, модулирующие связывание с C1q, G236R или E333S. В качестве контролей отдельные антитела также смешивали в соотношении 1: 1 с несвязывающими изотипными контрольными антителами IgG1-b12, чтобы обеспечить прямое сравнение концентраций индивидуальных компонентов и смесей, состоящих из них. Диапазон концентраций очищенных антител (диапазон конечных концентраций 0,003-10,0 мкг/мл; 3,3-кратные разведения) протестировали в анализе CDC *in vitro* на опухолевых клетках, полученных от трех пациентов с CLL с 20% NHS. Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC; ConversantBio) от трех пациентов с CLL оттаивали при 37°C, промывали в RPMI 1640 (Life technologies) с добавлением 10% донорской бычьей сыворотки с железом (DBSI; Life Technologies, кат. № 20371) и доводили до концентрации $3,33 \times 10^6$ PBMC/мл в RPMI + 0,2% BSA. В каждую лунку 96-луночного планшета добавляли 30 мкл (что соответствует 100 000 клеток/лунку), а также 50 мкл двукратной концентрации из серии разведений антител. После 15 минут инкубации при комнатной температуре на шейкере 20 мкл нечеловеческой сыворотки добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 45 минут

при 37°C. Затем клетки центрифугировали и промывали буфером для FACS (PBS + 0,1% BSA + 0,02% азид натрия). В каждую лунку добавляли пятьдесят мкл окрашивающей смеси и инкубировали в течение 30 минут при 4°C. После двукратного промывания планшетов с использованием буфера FACS процент жизнеспособных клеток измеряли на проточном цитометре Fortessa (BD).

Целевые уровни экспрессии CD20 и CD52 определяли способом количественной проточной цитометрии с использованием набора QIFI (DAKO; кат. № K0078). РВМС пациентов с CLL трех пациентов высевали по 100000 клеток/лунку в 96-луночный круглодонный планшет и центрифугировали для осаждения клеток. После удаления надосадочной жидкости первичные мышиные антитела анти-CD20 человека (IgG1-mm-IgG1-7D8-K409R) и –CD52 (Tebu Bio; кат. № MAB0944) или контрольные изотипические антитела добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 30-45 минут при 4°C. В отдельные лунки добавляли 50 мкл предоставленных набором гранул для настройки и калибровки. После центрифугирования клеток и удаления надосадочной жидкости клетки дважды промывали в буфере FACS. Затем клетки ресуспендировали в 50 мкл/лунку вторичного козьего антитела против мышиных IgG, конъюгированного с FITC (DAKO; кат. № F0479) и инкубировали 30-45 минут при 4°C в темноте. Клетки дважды промывали и в конечном итоге ресуспендировали в буфере FACS для анализа на проточном цитометре Fortessa. Количество антигена определяли путем расчета способности связывания антитела на основе калибровочной кривой в соответствии с инструкциями производителя.

Наибольшая эффективность CDC во всех трех образцах пациентов с CLL была индуцирована смесью IgG1-CAMPATH-1H-E430G и IgG1-11B8-E430G (Фигура 37A-C). Активность CDC отдельного агента IgG1-CAMPATH-1H-E430G была близка (пациенты 1, 2) или сопоставима (пациент 3) с уровнем, индуцированным смесью IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G. Способность индуцировать CDC с помощью IgG1-11B8-E430G в виде отдельных агентов варьировалась для каждого пациента, в пределах от отсутствия активности CDC (пациент 3) и промежуточной эффективности (пациент 1) до эффективности CDC, близкой к уровню, индуцированному отдельным агентом IgG1-CAMPATH-1H-E430G (пациент 2). Активность отдельного агента антительных вариантов IgG1-11B8 коррелировала с уровнями экспрессии CD20 в различных образцах (пациент 1: 48E + 03; пациент 2: 172E + 03; пациент 3: 39E + 03). Активность отдельного агента полностью отменялась при введении мутаций K439E-G236R в IgG1-CAMPATH-1H-E430G и мутаций S440K или S440K-E333S в IgG1-11B8-E430G. Однако эффективность CDC может быть восстановлена путем смешивания IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R

с IgG1-11B8-E430G-S440K или IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S. Степень восстановления эффективности CDC варьировала в зависимости от образца пациента.

В заключение необходимо отметить, что смеси антительных вариантов к CD20 и CD52, несущих мутации E430G, K439E или S440K и G236R или E333S, могут индуцировать CDC в образцах CLL пациентов зависимым образом.

Пример 40: Избирательное истощение популяций Т-клеток в образцах мононуклеарных клеток периферической крови.

Создание смесей взаимозависимых антител позволяет селективно истощить определенные гематологические подмножества из образцов цельной крови, как было продемонстрировано в Примере 20 для В-клеток, при этом Т-клетки остаются нетронутыми. Здесь мы проверили, могут ли смеси взаимозависимых антительных вариантов, несущих мутацию, усиливающую взаимодействие Fc-Fc, мутацию, ингибирующую самоолигомеризацию, и мутацию, модулирующую связывание с C1q, выборочно истощать Т-клетки из образцов цельной крови, оставляя при этом фракцию В-клеток нетронутой.

Тридцать мкл образцов цельной крови, полученных от четырех здоровых людей-доноров (UMC Utrecht), консервированных гирудином для предотвращения коагуляции, разделяли на аликвоты в 96-луночный круглодонный планшет (Greiner Bio-One; кат. № 650101) и добавляли 50 мкл RPMI + 0/2% BSA (Lonza; кат. № BE12-115F/U1). В каждую лунку добавляли 20 мкл смеси двух антительных вариантов (конечная концентрация 10 мкг/мл) антител IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-huCLB-T3/4 и IgG1-CD5-INSERM со следующими мутациями: E430G, которая вызывает усиление взаимодействий Fc-Fc; либо мутации K439E, либо S440K, ингибирующей самоолигомеризацию; и мутации G236R, G237A или K326A, модулирующие C1q. В качестве контролей отдельные антитела смешивали 1: 1 с вариантами несвязывающего изотипического контрольного антитела IgG1-b12, несущего мутации E430G, K439E, S440K, G236R или G237A, чтобы обеспечить прямое сравнение концентраций индивидуальных компонентов и смесей, состоящих из них. После инкубации в течение ночи при 37°C и 5% CO₂ планшеты центрифугировали и клетки один раз промывали 150 мкл PBS (B. Braun; кат. № A220/12257874/1110). Затем клетки ресуспендировали в 80 мкл аминореактивного красителя для определения жизнеспособности (Invitrogen; кат. № A10346A), разведенного 1: 1000 в PBS, и инкубировали в темноте в течение 30 минут при 4°C. Затем клетки центрифугировали и осадок ресуспендировали в 80 мкл смеси флуоресцентно меченных антител, направленных против CD3 (eBioscience; кат. № 48-0037), CD4 (eBioscience; кат. № 47-0048), CD8 (BioLegend; кат. № 301028), CD19 (BioLegend, кат. № 302245), CD45

(BioLegend; кат. № 368505), CD56 (BD; кат. № 564849) и CD66b (BioLegend; кат. № 305115), в дополнение к фиксируемому красителю для оценки жизнеспособности 510 (FVS510, BD; кат. № 564406). Клетки инкубировали в течение 30 минут при 4°C в темноте и затем центрифугировали перед лизированием эритроцитов с использованием холодного буфера для лизиса эритроцитов. Клетки промывали и помещали в буфер FACS (PBS + 0,1% BSA + 0,02% NaN₃) перед анализом образцов в фиксированном объеме 75 мкл на проточном цитометре (BD Fortessa). Долю В-клеток, CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток рассчитывали по следующей формуле: извлеченная фракция (целевая популяция,%) = 100% * (количество целевых клеток (образец)/количество целевых клеток (без контрольного Ab)) * (количество гранулоцитов (без контрольного Ab)/количество гранулоцитов (образец)). Здесь мы измеряем относительное извлечение клеток-мишеней, сравнивая их с количеством клеток в контрольных образцах, инкубированных без индуцирующих лизис антител, с поправкой на вызванную методом межпробную вариацию, используя популяцию гранулоцитов в качестве внутреннего контроля, поскольку на них не воздействуют направленно индуцирующие лизис антитела.

Варианты анти-CD52 антитела IgG1-CAMPATH-1H и антитела против CD3 IgG1-huCLB-T3/4 использовали для селективного истощения Т-клеток из образцов цельной крови без воздействия на В-клетки. При применении в виде отдельных агентов IgG1-CAMPATH-1H-E430G сильно истощило В-клетки, CD4⁺ Т-клетки и CD8⁺ Т-клетки, в то время как отдельный агент IgG1-huCLB-T3/4-E430G частично истощил CD4⁺ Т-клетки (Фигура 38A, B, C). Не наблюдалось истощения субпопуляций лимфоцитов смесью не связывающих мишень антительных вариантов IgG1-b12-E430G-K439E-G236R и IgG1-b12-E430G-S440K-G237A. Также не наблюдалось истощения, когда любой из последних антительных вариантов был смешан с комплементарным IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R или IgG1-huCLB-T3/4-E430G-S440K-K326A. Напротив, смесь IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R и IgG1-huCLB-T3/4-E430G-S440K-K326A сильно истощила CD4⁺ Т-клетки и в меньшей степени CD8⁺ Т-клетки взаимозависимым образом, без воздействия на количество В-клеток, подсчитываемых в этих образцах.

Кроме того, варианты анти-CD52 антитела IgG1-CAMPATH-1H и антитела анти-CD5 IgG1-CD5-INSERM использовали для селективного истощения Т-клеток из образцов цельной крови без воздействия на В-клетки. Опять же, сильное истощение В-клеток, CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток было вызвано отдельным агентом IgG1-CAMPATH-1H-E430G, в то время как единичный агент IgG1-CD5-INSERM-E430G не истощал ни одну из проанализированных популяций лимфоцитов (Фигура 38D, E, F). Не наблюдалось истощения субпопуляций лимфоцитов смесью не связывающих мишень антительных

вариантов IgG1-b12-E430G-K439E-G236R и IgG1-b12-E430G-S440K-G237A. Также не наблюдалось истощения, когда любой из последних антительных вариантов был смешан с комплементарным IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R или IgG1-CD5-INSERM-E430G-S440K-K326A. Напротив, смесь IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R и IgG1-CD5-INSERM-E430G-S440K-K326A сильно и селективно истощала CD4⁺ Т-клетки, но не В-клетки, взаимозависимым образом. Воздействие на CD8⁺ Т-клетки смесью IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-K326A и IgG1-CD5-INSERM-E430G-S440K-G237A варьировало в зависимости от донора.

В заключение необходимо отметить, что смеси антительных вариантов анти-CD52 IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-huCLB-T3/4 и IgG1-CD5-INSERM, несущие мутацию E430G, усиливающую взаимодействие Fc-Fc, мутации, ингибирующие самоолигомеризацию, K439E или S440K, и мутации, модулирующие связывание с C1q, G236R или G237A, могут применяться для селективного и взаимозависимого истощения популяций Т-клеток из образцов цельной крови здоровых доноров, при этом популяция В-клеток остается неповрежденной.

В сочетании с результатами в Примере 20 это свидетельствует о том, что комбинации антител, содержащие Fc-домены, несущие мутации, раскрытые в настоящем изобретении, могут быть использованы для избирательного истощения различных гематологических подмножеств помимо В-клеток, CD8⁺ Т-клеток или CD4⁺ Т-клеток, с помощью целевых комбинаций, коэкспрессия которых является селективным признаком целевого гематологического подмножества.

Пример 41: Взаимозависимая индукция запрограммированной гибели клеток смесями вариантов анти-DR4 и анти-DR5 антител, несущих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q

Был проведен анализ жизнеспособности, чтобы изучить, могут ли смеси антительных вариантов анти-DR4 и анти-DR5 антител, несущих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и модулируют связывание с C1q, взаимозависимо индуцировать программируемую гибель клеток (PCD) клеток рака поджелудочной железы человека ВхРС-3 и клеток рака толстой кишки COLO 205.

Различные мутации были введены в анти-DR4 антитело IgG1-DR4-chCTB007 и анти-DR5 антитело IgG1-DR5-01: E430G, которые индуцирует усиленные взаимодействия Fc-Fc; либо мутации, ингибирующей самоолигомеризацию, K439E или S440K; мутации, модулирующие связывание с C1q, G237T, K326W или E333S, которые подавляют (G237T)

или усиливают (K326W, E333S) связывание с C1q. В качестве контролей отдельные антитела также смешивали 1:1 с вариантами несвязывающих изотипических контрольных антител IgG1-b12, несущих мутации E430G-K439E или E430G-S440K, чтобы обеспечить прямое сравнение концентраций индивидуальных компонентов и смесей, состоящих из них. Анализ жизнеспособности проводили, как описано в Примере 14. Вкратце, 90 мкл суспензий отдельных клеток (5000 клеток на лунку) высевали в 96-луночные планшеты с плоским дном из полистирола (Greiner Bio-One, кат. № 655182) и инкубировали в течение ночи при 37°C. Добавляли серию серийных разведений смесей антител по 20 мкл (конечные концентрации от 0,0003 до 20 мкг/мл в 5-кратных разведениях) и 10 мкл C1q (Quidel; конечная концентрация 2,5 мкг/мл) и инкубировали в течение 3 дней при 37°C. В качестве отрицательного и положительного контроля индукции гибели клеток клетки инкубировали без антител или с 5 мкМ стауроспорином, соответственно. Жизнеспособность культивируемых клеток определяли с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo, как описано в Примере 14. Данные были проанализированы и нанесены на график с использованием нелинейной регрессии (сигмоидальная доза-реакция с переменным наклоном) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Процент жизнеспособных клеток рассчитывали по следующей формуле: % жизнеспособных клеток = [(люминесценция образца антитела - люминесценция образца стауроспорина)/(люминесценция образца без антител - люминесценция образца стауроспорина)] * 100.

Запрограммированной гибели клеток в клетках VxPC-3 или COLO 205 под действием IgG1-DR5-01-E430G-K439E-G237T при применении в виде отдельных агентов не наблюдалось (Фигура 39А, В). IgG1-DR4-chCTB007-E430G-S440K-K326W-E333S действительно вызывало запрограммированную гибель клеток при применении в виде отдельных агентов, о чем свидетельствуют около 67% и 60% жизнеспособных клеток, оставшихся в анализах VxPC-3 и COLO 205, соответственно, при самых высоких используемых концентрациях. Способность IgG1-DR4-chCTB007-E430G-S440K-K326W-E333S вызывать запрограммированную гибель клеток может быть увеличена путем смешивания его с IgG1-DR5-01-E430G-K439E-G237T - это эффект, который наблюдался при использовании обеих клеточных линий.

В совокупности взаимозависимая активация запрограммированной гибели клеток в раковых клетках VxPC-3 и COLO 205 может быть достигнута с помощью смесей вариантов анти-DR4 и -DR5 антител, содержащих мутации, которые усиливают взаимодействия Fc-Fc, ингибируют самоолигомеризацию и ингибируют (G237T) или усиливают (K326W-E333S) связывание с C1q.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Первое антитело, содержащее первую Fc-область IgG человека и первую антигенсвязывающую область, способную связываться с первым антигеном, для применения в качестве лекарственного средства в сочетании со вторым антителом, содержащим вторую Fc-область IgG человека и вторую антигенсвязывающую область, способная связываться со вторым антигеном, причем указанная первая Fc-область включает

a. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

b. замену K439E или S440K, при условии, что замена не является S440K, если замена в (a) представляет собой S440Y или S440W, и

c. одну замену аминокислоты в положении G237 или одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R, G236K, K322A, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q и L235E;

а указанная вторая Fc-область включает

d. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

e. замену K439E или S440K при условии, что замена не является S440K, если замена в (d) представляет собой S440Y или S440W,

где первая Fc-область имеет замену K439E, а вторая Fc-область имеет замену S440K, или первая Fc-область имеет замену S440K, а вторая Fc-область имеет замену K439E; где положения аминокислот соответствуют IgG1 человека в соответствии с системой нумерации EU.

2. Первое антитело, содержащее первую Fc-область IgG человека и первую антигенсвязывающую область, способную связываться с первым антигеном, для применения в качестве лекарственного средства в сочетании со вторым антителом, содержащим вторую Fc-область IgG человека и вторую антигенсвязывающую область, способная связываться со вторым антигеном, причем указанная первая Fc-область включает

a. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или

S440W, и

b. замену K439E или S440K, при условии, что замена не является S440K, если замена в (a) представляет собой S440Y или S440W, и

c. одну замену аминокислоты в положении P329 или замену K322E;

а указанная вторая Fc-область включает

d. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

e. замену K439E или S440K, при условии, что замена не S440K, если замена в (d) представляет собой S440Y или S440W и

f. одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: K326A, K326W, E333A и E333S;

где первая Fc-область имеет замену K439E, а вторая Fc-область имеет замену S440K или первая Fc-область имеет замену S440K, а вторая Fc-область имеет замену K439E; где положения аминокислот соответствуют IgG1 человека в соответствии с системой нумерации EU.

3. Первое антитело, содержащее первую Fc-область IgG человека и первую антигенсвязывающую область, способную связываться с первым антигеном, для применения в качестве лекарственного средства в сочетании со вторым антителом, содержащим вторую Fc-область IgG человека и вторую антигенсвязывающую область, способная связываться со вторым антигеном, причем указанная первая Fc-область включает

a. замену K248E и T437R, и

b. замену K439E или S440K, и

c. одну замену аминокислоты в положении G237 или P329, или одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R, G236K, K322A, K332E, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q и L235E;

а указанная вторая Fc-область включает

d. замену K248E и T437R, и

e. замену aK439E или S440K,

где первая Fc-область имеет замену K439E, а вторая Fc-область имеет замену S440K, или первая Fc-область имеет замену S440K, а вторая Fc-область имеет замену K439E; где положения аминокислот соответствуют IgG1 человека в соответствии с системой нумерации EU.

4. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в

комбинации со вторым антителом по любому из пп. 1 и 2, отличающееся тем, что первая и вторая Fc-области включают замену, выбранную из группы, состоящей из: E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W и S440Y.

5. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из пп. 1-2 и 4, отличающееся тем, что первая и вторая Fc-область включают замену, выбранную из группы, состоящей из: E430G, E345K и E345R.

6. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из пп. 1-2 и 4-5, отличающееся тем, что первая и вторая Fc-области включают замену E430G.

7. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из пп.1 и 3-6, где первая Fc-область включает одну замену, выбранную из группы, состоящей из: G237A, G237T, G237Q, G237R, G237S, G237N, G237D, G237E, G237K, G237V, G237M, G237I, G237L, G237H, G237F, G237Y, G237W, G237P.

8. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из пп.1 и 3-7, отличающееся тем, что первая Fc-область включает одну замену, выбранную из группы, состоящей из: G237A, G237T, G237S, G237Q, G237R.

9. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из пп. 1 и 3-8, отличающееся тем, что первая Fc-область включает замену G237Q.

10. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из пп.1 и 3-6, отличающееся тем, что первая Fc-область включает одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R и E269K.

11. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из пп. 1, 3-6 и 10, отличающееся тем, что первая Fc-область включает замену G236R.

12. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из пп. 1, 3-6 и 10, отличающееся тем, что первая Fc-область включает замену E269K.

13. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из пп. 1 и 3-6, отличающееся тем, что первая Fc-область включает замену K322A.

14. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из пп. 2-6, отличающееся тем, что первая Fc-область включает замену P329R.

15. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из пп. 2-6, отличающееся тем, что первая Fc-область включает замену K322E.

16. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из пп. 1 и 3-13, отличающееся тем, что вторая Fc-область включает одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G237A, K326A, K326W, E333A и E333S.

17. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из пп. 1, 3-13 и 16, отличающееся тем, что вторая Fc-область включает замену G237A.

18. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из пп. 1-15, отличающееся тем, что вторая Fc-область включает одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: K326A, K326W, E333A и E333S.

19. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из пп. 1-15 и 18, отличающееся тем, что вторая Fc-область включает одну замену, выбранную из группы, состоящей из: K326A, K326W, E333A и E333S.

20. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из пп. 1, 3-13 и 16-17, отличающееся тем, что вторая Fc-область включает замену G237A и E333S.

21. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из пп. 1-19, отличающееся тем, что вторая Fc-область включает замену K326A.

22. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из пп. 1-19, отличающееся тем, что вторая Fc-область включает замену E333S.

23. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из пп. 1-16 и 18, отличающееся тем, что вторая Fc-область включает две замены, выбранные из группы, состоящей из: K326A, K326W, E333A и E333S.

24. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в

комбинации со вторым антителом по любому из пп. 1-16, 18 и 23, отличающееся тем, что вторая Fc-область включает замену K326W и E333S.

25. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из пп. 1-16, 18 и 23, отличающееся тем, что вторая Fc-область включает замену K326A и E333A.

26. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что первое и/или второе антитело является человеческим, гуманизированным или химерным.

27. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что первое и/или второе антитело представляет собой моноклональное антитело.

28. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что первое и/или второе антитело является изотипом IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

29. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что первое и/или второе антитело является изотипом IgG1 человека.

30. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что первый и второй антигены представляют собой молекулы, экспонированные на клеточной поверхности.

31. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что первый и второй антигены совместно расположены в клетках или тканях, которые являются клетками-мишенями или тканью-мишенью заболевания или расстройства, подвергаемого лечению.

32. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что первый и второй антигены не идентичны.

33. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что лекарственное средство истощает популяцию клеток, экспрессирующих первый и второй антиген.

34. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в

комбинации со вторым антителом по п. 33, отличающееся тем, что популяция клеток представляет собой опухолевую клетку.

35. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из пп. 33-34, отличающееся тем, что популяция клеток представляет собой гематологическую опухолевую клетку или солидную опухолевую клетку.

36. Первое антитело для применения в качестве лекарственного средства в комбинации со вторым антителом по любому из пп. 33-34, отличающееся тем, что популяция клеток представляет собой лейкоциты, лимфоциты, В-клетки, Т-клетки, регуляторные Т-клетки, НК-клетки, супрессорные клетки миелоидного происхождения, клеточная популяция макрофагов, ассоциированных с опухолью.

37. Антитело, содержащее Fc-область IgG человека и антигенсвязывающую область, способную связываться с антигеном, отличающееся тем, что указанная Fc-область включает

a. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

b. замену K439E или S440K, при условии, что замена не является S440K, если замена в (a) представляет собой S440Y или S440W, и

c. одну замену аминокислоты в положении G237 или одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R, G236K, K322A, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q и L235E.

38. Антитело, содержащее Fc-область IgG человека и антигенсвязывающую область, способную связываться с антигеном, отличающееся тем, что указанная Fc-область включает

a. замену K248E и T437R, и

b. замену K439E или S440K, и

c. одну замену аминокислоты в положении G237 или P329, или одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R, G236K, K322A,

d. K332E, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q, L235E, K326A, K326W, E333A и E333S.

39. Антитело по п. 37, отличающееся тем, что Fc-область включает замену, выбранную из группы, состоящей из: E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W и S440Y.

40. Антитело по любому из пп. 37 и 39, отличающееся тем, что Fc-область

включает замену, выбранную из группы, состоящей из: E430G, E345K и E345R.

41. Антитело по любому из пп. 37 и 39-41, отличающееся тем, что Fc- Fc-область-области включает замену E430G.

42. Антитело по любому из пп. 37-41, отличающееся тем, что Fc-область включает одну замену, выбранную из группы, состоящей из: G237A, G237T, G237Q, G237R, G237S, G237N, G237D, G237E, G237K, G237V, G237M, G237I, G237L, G237H, G237F, G237Y, G237W, G237P.

43. Антитело по любому из пп. 37-42, отличающееся тем, что Fc-область включает одну замену, выбранную из группы, состоящей из: G237A, G237T, G237S, G237Q, G237R.

44. Антитело по любому из пп. 37-43, отличающееся тем, что Fc-область включает замену G237Q или G237A.

45. Антитело по любому из пп. 37-41, отличающееся тем, что Fc-область включает одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R и E269K.

46. Антитело по любому из пп. 37-41 и 45, отличающееся тем, что Fc-область включает замену G236R.

47. Антитело по любому из пп. 37-41 и 45, отличающееся тем, что Fc-область включает замену E269K.

48. Антитело по любому из пп. 37-41, отличающееся тем, что Fc-область включает замену K322A.

49. Антитело по любому из пп. 37-48, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

50. Антитело по любому из пп. 37-49, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой изотип IgG1 человека.

51. Композиция, содержащая первое и второе антитело, отличающаяся тем, что первое антитело включает первую антигенсвязывающую область и первую Fc-область по любому из пп. 1-15 и 26-36, а второе антитело включает вторую антигенсвязывающую область и вторую Fc-область по любому из пп. 1-6 и 16-36.

52. Композиция, содержащая первое и второе антитело, отличающаяся тем, что первое антитело включает первую антигенсвязывающую область, способную связываться с первым антигеном и первой Fc-областью IgG человека, а второе антитело включает вторую антигенсвязывающую область, способную связывания со вторым антигеном и второй Fc-областью IgG человека, где указанная первая Fc-область включает

а. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей

из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

b. замену K439E или S440K, при условии, что замена не является S440K, если замена в (a) представляет собой S440Y или S440W, и

c. одну замену аминокислоты в положении G237 или одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R, G236K, K322A, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q и L235E;

а указанная вторая Fc-область включает

d. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

e. замену K439E или S440K при условии, что замена не является S440K, если замена в (d) представляет собой S440Y или S440W,

где первая Fc-область имеет замену K439E, а вторая Fc-область имеет замену S440K или первая Fc-область имеет замену S440K, а вторая Fc-область имеет замену K439E,

где положения аминокислот соответствуют IgG1 человека в соответствии с системой нумерации EU.

53. Композиция, содержащая первое и второе антитело, отличающаяся тем, что первое антитело включает первую антигенсвязывающую область, способную связываться с первым антигеном и первой Fc-областью IgG человека, а второе антитело включает вторую антигенсвязывающую область, способную связывания со вторым антигеном и второй Fc-областью IgG человека, где указанная первая Fc-область включает

a. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

b. замену K439E или S440K, при условии, что замена не является S440K, если замена в (a) представляет собой S440Y или S440W, и

c. одну замену аминокислоты в положении P329 или замену K322E;

а указанная вторая Fc-область включает

d. одну замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представляет собой S440Y или S440W, и

e. замену K439E или S440K, при условии, что замена не является S440K, если замена в (d) представляет собой S440Y или S440W, и

f. одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: K326A, K326W, E333A и E333S,

где первая Fc-область имеет замену K439E, а вторая Fc-область имеет замену S440K, или первая Fc-область имеет замену S440K, а вторая Fc-область имеет замену K439E, где положения аминокислот соответствуют IgG1 человека согласно системе нумерации EU.

54. Композиция, содержащая первое и второе антитело, отличающаяся тем, что первое антитело включает первую антигенсвязывающую область, способную связываться с первым антигеном и первой Fc-областью IgG человека, а второе антитело включает вторую антигенсвязывающую область, способную связывания со вторым антигеном и второй Fc-областью IgG человека, где указанная первая Fc-область включает

a. замену K248E и T437R, и

b. замену K439E или S440K, и

c. одну замену аминокислоты в положении G237 или P329, или одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R, G236K, K322A, K332E, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q и L235E;

а указанная вторая Fc-область включает

d. замену K248E и T437R, и

e. одну замена K439E или S440K,

где первая Fc-область имеет замену K439E, а вторая Fc-область имеет замену S440K, или первая Fc-область имеет замену S440K, а вторая Fc-область имеет замену K439E; где положения аминокислот соответствуют IgG1 человека в соответствии с системой нумерации EU.

55. Композиция по любому из пп. 52-53, отличающаяся тем, что первая и вторая Fc-области включают замену, выбранную из группы, состоящей из: E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W и S440Y.

56. Композиция по любому из пп. 52-53 и 55, отличающаяся тем, что первая и вторая Fc-области включают замену, выбранную из группы, состоящей из: E430G, E345K и E345R.

57. Композиция по любому из пп. 52-53 и 55-56, отличающаяся тем, что первая и вторая Fc-области включают замену E430G.

58. Композиция по любому из пп. 52-57, отличающаяся тем, что первая Fc-область включает одну замену, выбранную из группы, состоящей из: G237A, G237T, G237Q, G237R, G237S, G237N, G237D, G237E, G237K, G237V, G237M, G237I., G237L, G237H, G237F, G237Y, G237W, G237P.

59. Композиция по любому из пп. 52-58, отличающаяся тем, что первая Fc-область включает одну замену, выбранную из группы, состоящей из: G237A, G237T, G237Q, G237R и G237S.

60. Композиция по любому из пп. 52-59, отличающаяся тем, что первая Fc-область включает замену G237Q.

61. Композиция по любому из пп. 52-57, отличающаяся тем, что первая Fc-область включает одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G236R и E269K.

62. Композиция по любому из пп. 52-57 и 61, отличающаяся тем, что первая Fc-область включает замену G236R.

63. Композиция по любому из пп. 52-57 и 61, отличающаяся тем, что первая Fc-область включает замену E269K.

64. Композиция по любому из пп. 52, 54-57, отличающаяся тем, что первая Fc-область включает замену K322A.

65. Композиция по любому из пп. 53-57, отличающаяся тем, что первая Fc-область включает замену P329R.

66. Композиция по любому из пп. 53-57, отличающаяся тем, что первая Fc-область включает замену K322E.

67. Композиция по любому из пп. 52, 54-64, отличающаяся тем, что вторая Fc-область включает одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: G237A, K326A, K326W, E333A и E333S.

68. Композиция по любому из пп. 52, 54-64 и 67, отличающаяся тем, что вторая Fc-область включает замену G237A.

69. Композиция по любому из пп. 52-67, отличающаяся тем, что вторая Fc-область включает одну замену, выбранную из группы, состоящей из: K326A, K326W, E333A и E333S.

70. Композиция по любому из пп. 52-67 и 69, отличающаяся тем, что вторая Fc-область включает две замены, выбранные из группы, состоящей из: K326A, K326W, E333A и E333S.

71. Композиция по любому из пп. 52, 67-69 и 70, отличающаяся тем, что вторая Fc-область включает замену K326W и E333S.

72. Композиция по любому из пп. 52-67 и 69-70, отличающаяся тем, что вторая Fc-область включает замену K326A и E333A.

73. Композиция по любому из пп. 52-67 и 69, отличающаяся тем, что вторая Fc-область включает замену E333S.

74. Композиция по любому из пп. 52, 54-67, отличающаяся тем, что вторая Fc-область включает замену G237A и E333S.

75. Композиция по любому из пп. 51-74, отличающаяся тем, что первый и второй антигены представляют собой молекулы, экспонированные на клеточной поверхности.

76. Композиция по любому из пп. 51-75, отличающаяся тем, что первый и второй антигены не идентичны.

77. Композиция по любому из пп. 51-76, отличающаяся тем, что первое антитело и второе антитело присутствуют в композиции в молярном соотношении от около 1:50 до 50:1, таком как молярное соотношение около 1:1, молярное соотношение около 1:2, молярное соотношение около 1:3, молярное соотношение около 1:4, молярное соотношение около 1:5, молярное соотношение около 1:6, молярное соотношение около 1:7, молярное соотношение около 1:8, молярное соотношение около 1:9, молярное соотношение около 1:10, молярное соотношение около 1:15, молярное соотношение около 1:20, молярное соотношение около 1:25, молярное соотношение около 1:30, молярное соотношение около 1:35, молярное соотношение около 1:40, молярное соотношение около 1:45, молярное соотношение около 1:50, молярное соотношение около 50:1, молярное соотношение около 45:1, молярное соотношение около 40:1, молярное соотношение около 35:1, молярное соотношение около 30:1, молярное соотношение 25:1, молярное соотношение 20:1, молярное соотношение 15:1, молярное соотношение 10:1, молярное соотношение 9:1, молярное соотношение 8:1, молярное соотношение 7:1, 6:1 молярное соотношение, молярное соотношение 5:1, молярное соотношение 4:1, молярное соотношение 3:1, молярное соотношение 2:1.

78. Композиция по любому из пп. 51-77, отличающаяся тем, что первое антитело и второе антитело присутствуют в композиции в молярном соотношении от около 1:50 до 50:1, таком как молярное отношение около от 1:40 до 40:1, такое как молярное соотношение от около 1:30 до 30:1, такое как молярное соотношение от около 1:20 до 20:1, такое как молярное соотношение от около 1:10 до 10:1, такое как молярное соотношение от около 1:9 до 9:1, такое как молярное соотношение от около 1:5 до 5:1.

79. Композиция по любому из пп. 51-78, отличающаяся тем, что первое антитело и второе антитело присутствуют в композиции в молярном соотношении 1:1.

80. Композиция по любому из пп. 51-79, отличающаяся тем, что композиция дополнительно содержит фармацевтический носитель или наполнитель.

81. Композиция по любому из пп. 51-80, отличающаяся тем, что композиция представляет собой фармацевтическую композицию.

82. Композиция по любому из предшествующих пп. для применения в качестве лекарственного средства.

83. Первое или второе антитело по любому из пп. 1-36, антитело по любому из пп. 37-50 или композиция по любому из пп. 51-82, отличающиеся тем, что антигенсвязывающая область способна к связыванию с антигеном, выбранным из группы, состоящей из: DR4, DR5, CD20, CD37, CD52, HLA-DR, CD3, CD5, 4-1BB, PD1.

84. Первое или второе антитело по любому из пп. 1-36 и 83, антитело по любому из пп. 37-50 и 83 или композиция по любому из пп. 51-83, отличающиеся тем, что антигенсвязывающий регион включает:

a. область VH, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 196, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 196, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 198, и область VL, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 200, последовательность CDR2, как указано в: AAT, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 201 [DR4];

b. область VH, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 50, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 51, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 52, и область VL, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 54, последовательность CDR2, как указано в: FAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 55 [DR5-01-G56T];

c. область VH, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 57, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 58, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 59, и область VL, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 61, последовательность CDR2, как указано в: RTS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 62 [DR5-05];

d. область VH, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 36, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 37, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 38, и область VL, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 40, последовательность CDR2, как указано в: DAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 41 [CD20, 7D8];

e. область VH, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 9, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 10, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 11, и область VL, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 13, последовательность CDR2, как указано в: DAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 14 [CD20, 11B8];

f. область VH, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID

NO: 43, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 44, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 45, и область VL, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 47, последовательность CDR2, как указано в: VAT, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 48 [CD37];

g. область VH, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 3, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 4, и область VL, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 6, последовательность CDR2, как указано в: NTN, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 7 [CD52, CAMPATH-1H];

h. область VH, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 161, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 162, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 163, и область VL, содержащую CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 165, последовательность CDR2, указанная в: LVS, и последовательность CDR3, указанная в SEQ ID NO: 166 [CD52, h2E8];

i. область VH, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 168, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 169, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 170, и область VL, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 172, последовательность CDR2, как указано в SEQ ID NO: AAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 173 [HLA-DR, hul243];

j. область VH, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 175, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 176, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 177, и область VL, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 179, последовательность CDR2, указанную в: DNN, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 180 [HLA-DR, 1D09C3];

k. область VH, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 182, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 183, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 184, и область VL, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 186, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: DTS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 187 [CD3, huCLB T3/4]; или

l. область VH, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 189, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 190, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 191, и область VL, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 193, последовательность CDR2, указанную в: ATS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 194 [CD5].

85. Способ лечения индивидуума, страдающего заболеванием, включающий

введение указанному индивидууму эффективного количества первого и второго антитела по пп. 1-37 и 83-84, антитела по любому из пп. 37-50 и 83-84. или композиции по любому из пп. 51-84.

86. Способ по п. 85, отличающийся тем, что заболевание выбрано из группы, включающей рак, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание и инфекционное заболевание.

87. Способ по любому из пп. 85-86, отличающийся тем, что способ включает введение дополнительного терапевтического агента.

88. Способ истощения популяции клеток, экспрессирующих первый антиген и второй антиген, который включает контакт указанной популяции клеток с первым и вторым антителом, антителом или композицией по пп. 1-84.

89. Способ по п. 88, отличающийся тем, что популяция клеток представляет собой популяцию опухолевых клеток, такую как популяция гематологических опухолевых клеток или популяция солидных опухолевых клеток.

90. Способ индукции пролиферации в популяции клеток, экспрессирующих первый антиген и второй антиген, который включает приведение в контакт указанной популяции клеток с первым и вторым антителом, антителом или композицией по пп. 1-84.

91. Способ по любому из пп. 88-90, отличающийся тем, что популяция клеток присутствует в крови.

92. Способ по любому из пп. 88-91, отличающийся тем, что популяция клеток представляет собой лейкоциты.

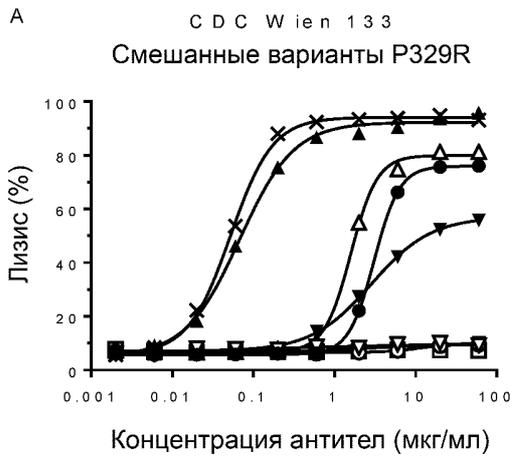
93. Способ по любому из пп. 88-92, отличающийся тем, что популяция клеток представляет собой подмножество популяции лейкоцитарных клеток.

94. Способ по любому из пп. 88-93, отличающийся тем, что популяция клеток представляет собой популяцию лимфоцитов.

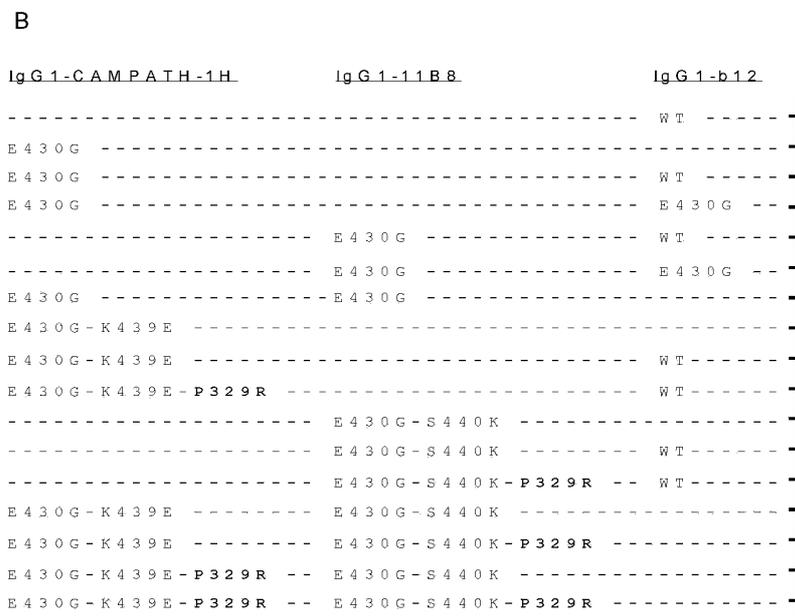
95. Способ по п. 94, отличающийся тем, что популяция клеток представляет собой популяцию В-клеток, популяцию Т-клеток, популяцию НК-клеток, популяцию регуляторных Т-клеток, популяцию клеток-супрессоров миелоидного происхождения.

96. Способ по любому из пп. 85-95, отличающийся тем, что первый и/или второй антиген является членом TNFR-SF.

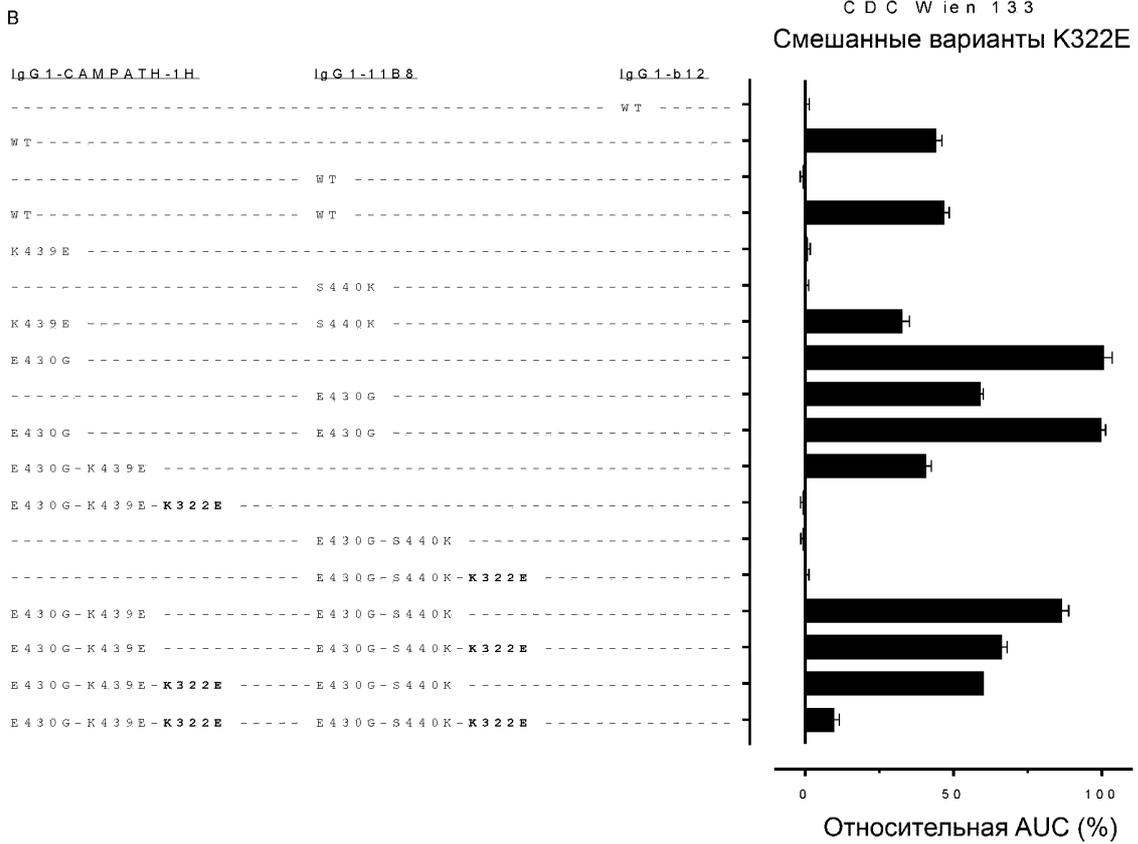
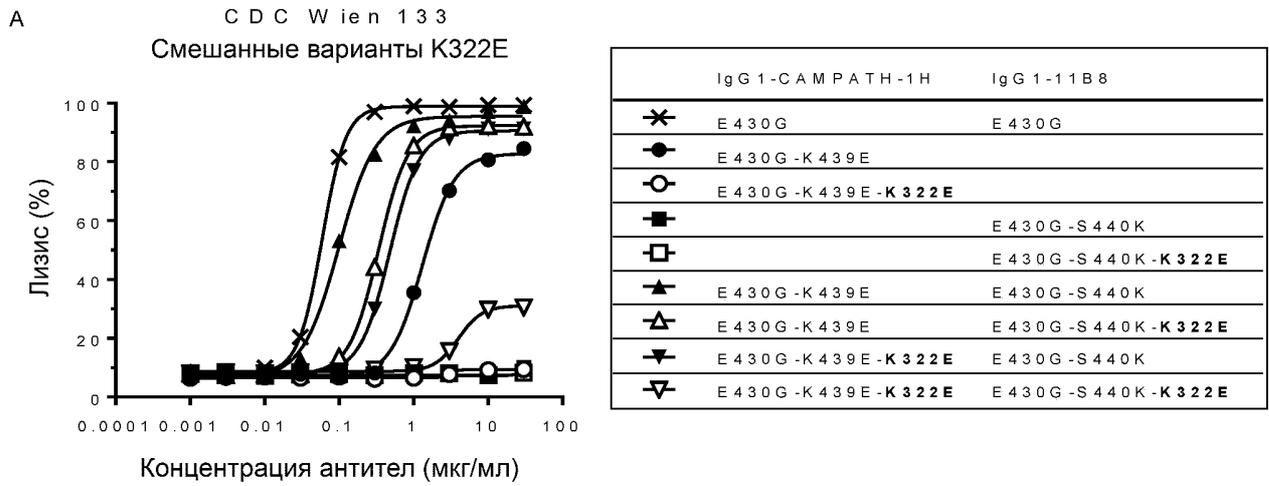
97. Набор, содержащий первый контейнер, содержащий первое антитело, определенное в любом из пп. 1-15, 26-36 и 83-84, и второй контейнер, содержащий второе антитело, определенное в любом из пп. 1-6, 16-36 и 83-84.



	Ig G 1-CAMPATH-1H	Ig G 1-11B8	Ig G 1-b 12
✕	E 430 G	E 430 G	
●	E 430 G -K 439 E		W T
○	E 430 G -K 439 E -P 329 R		W T
■		E 430 G -S 440 K	W T
□		E 430 G -S 440 K -P 329 R	W T
▲	E 430 G -K 439 E	E 430 G -S 440 K	
△	E 430 G -K 439 E	E 430 G -S 440 K -P 329 R	
▼	E 430 G -K 439 E -P 329 R	E 430 G -S 440 K	
▽	E 430 G -K 439 E -P 329 R	E 430 G -S 440 K -P 329 R	



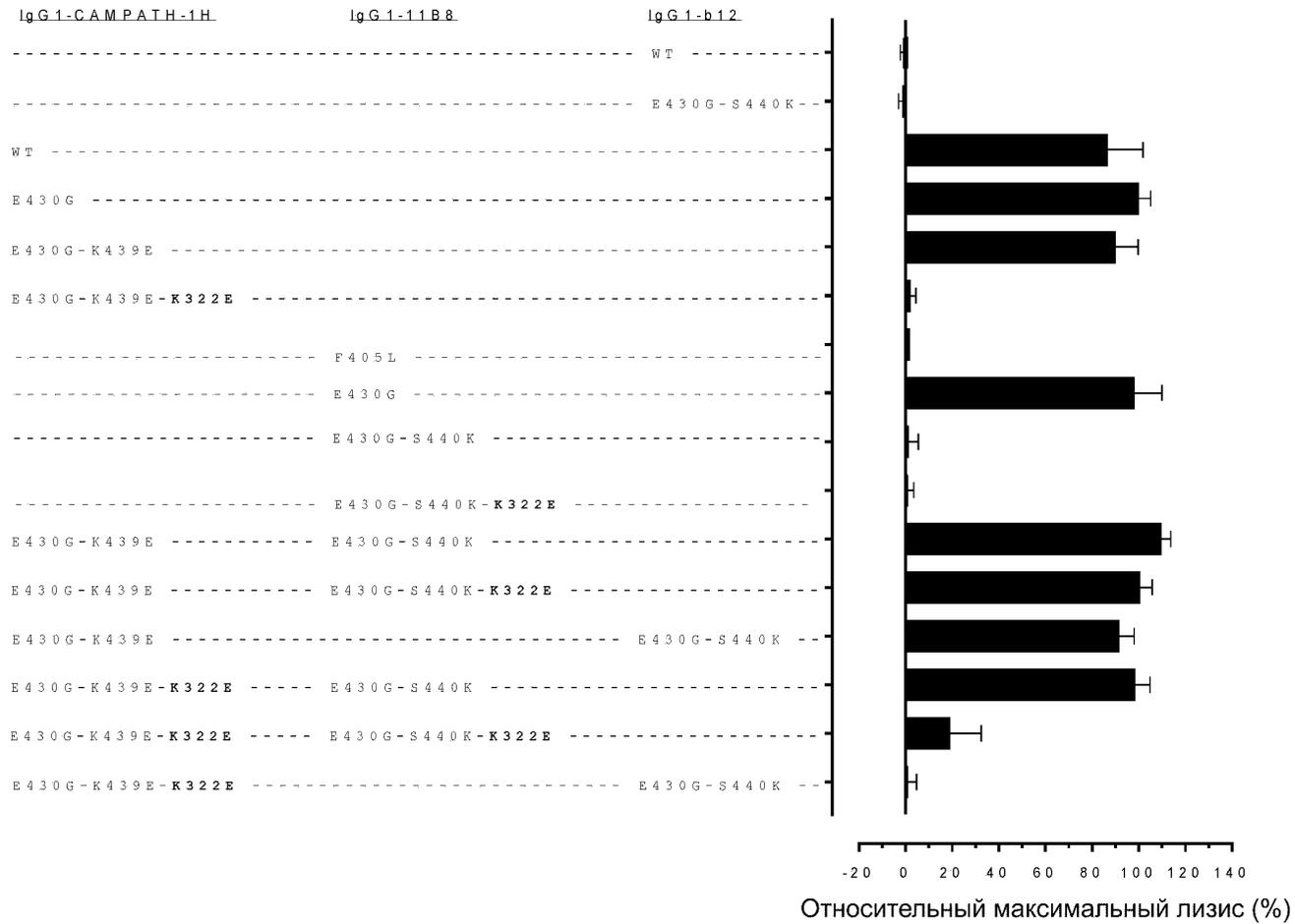
Фиг. 1



Фиг. 2

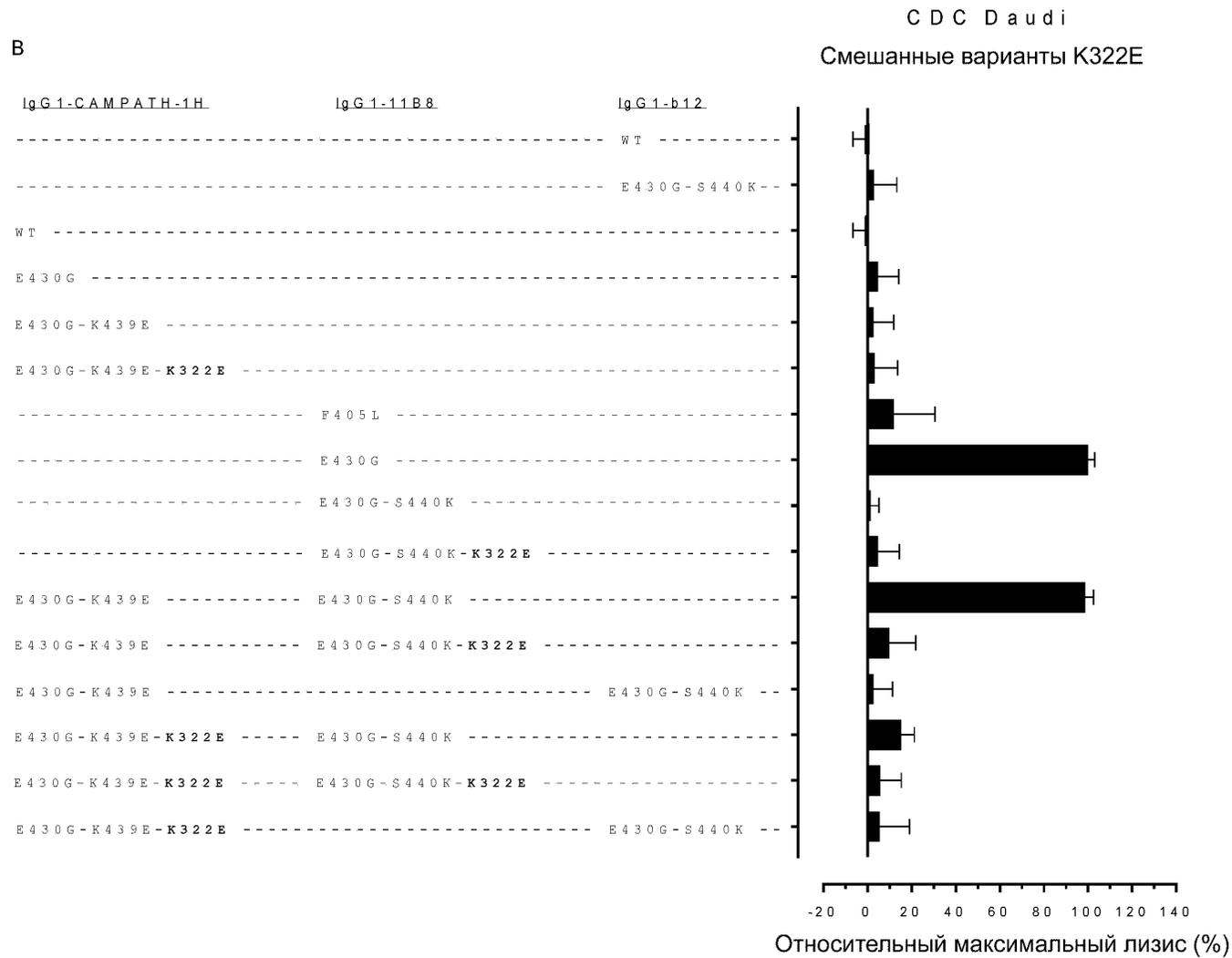
CDC Wien 133
Смешанные варианты K322E

A



3/92

Фиг. 3

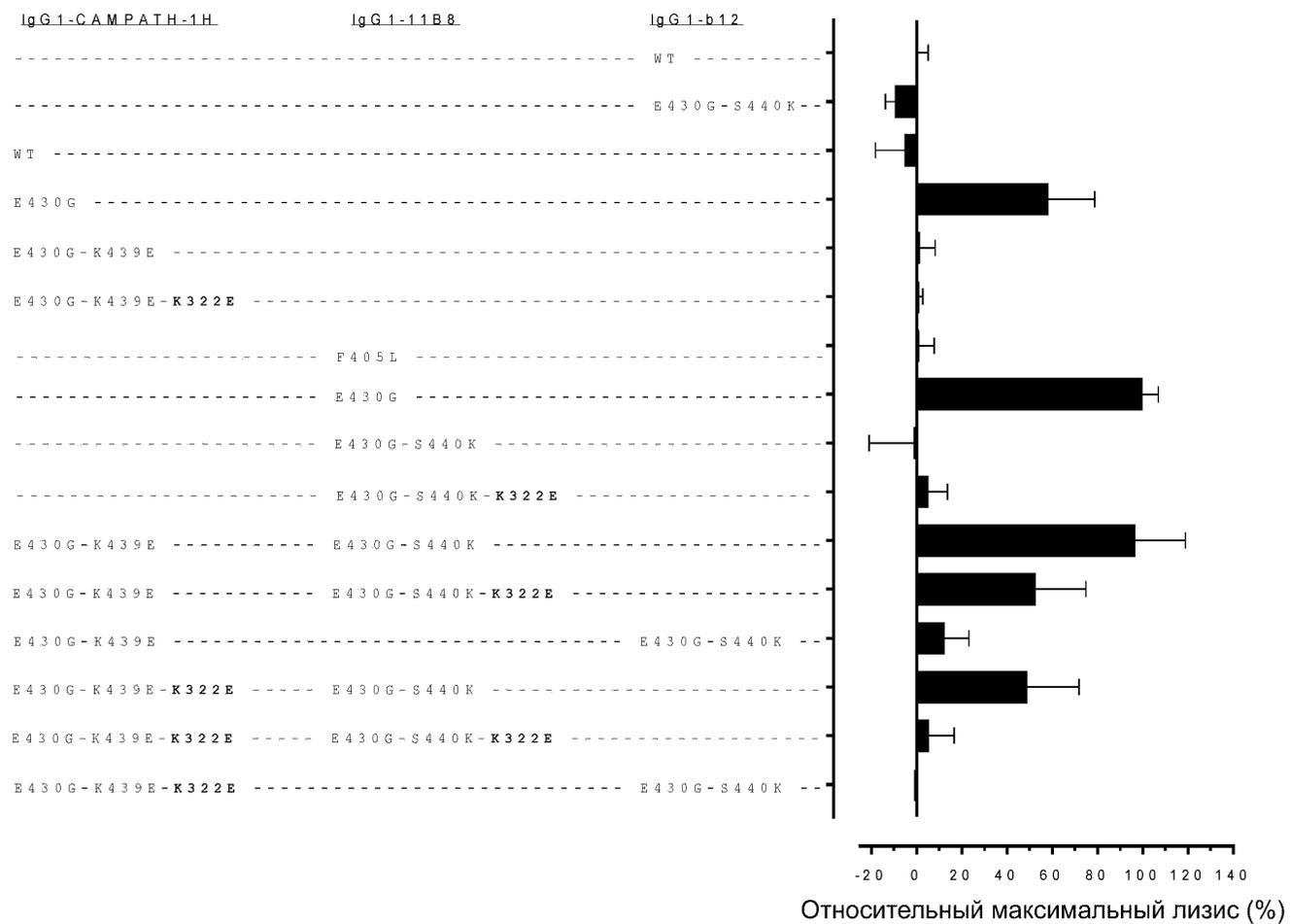


4/92

Фиг. 3 (ПРИЛОЖЕНИЕ)

C

C D C R a j i
Смешанные варианты K322E

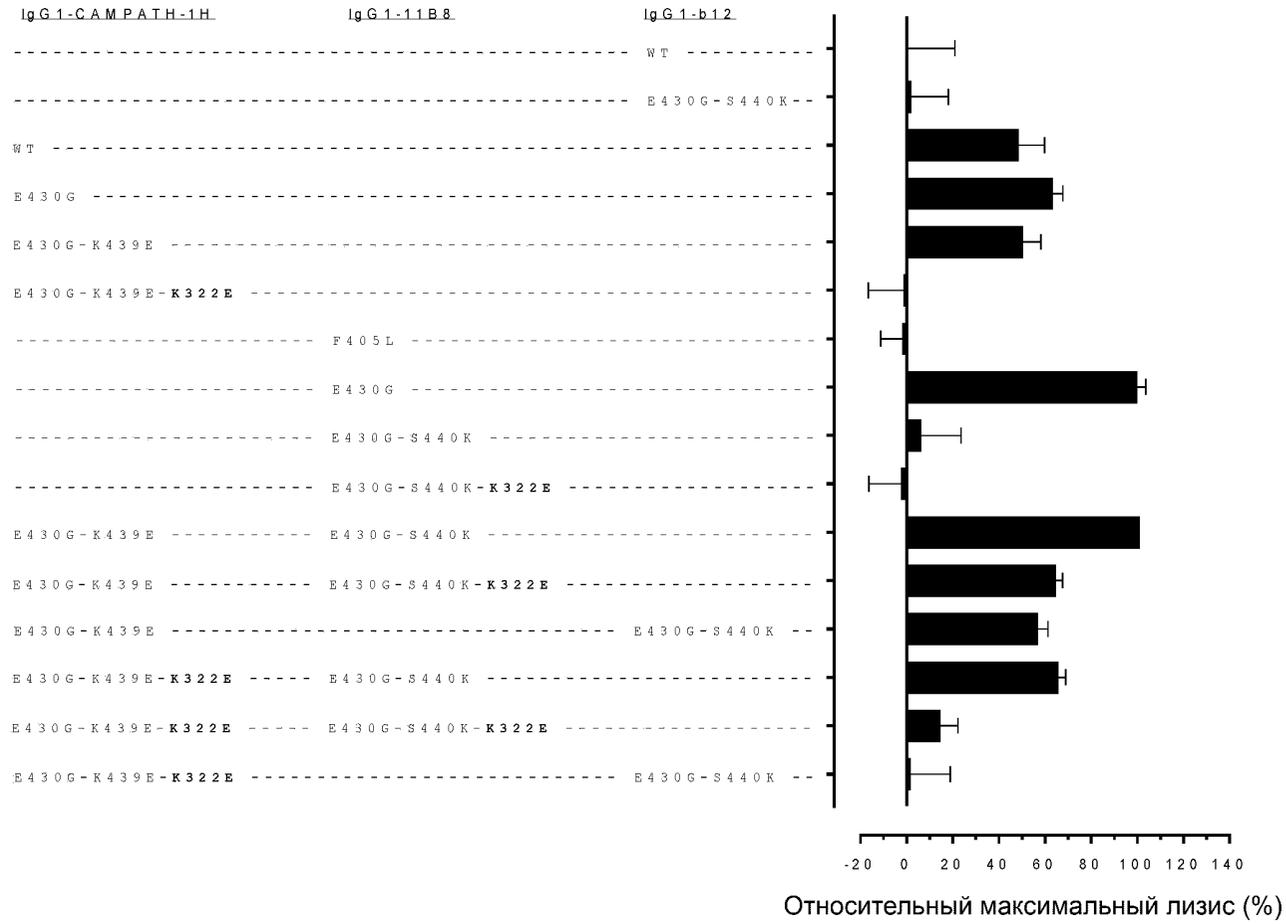


5/92

ФИГ. 3 (ПРИЛОЖЕНИЕ)

D

C D C R a m o s
Смешанные варианты K322E

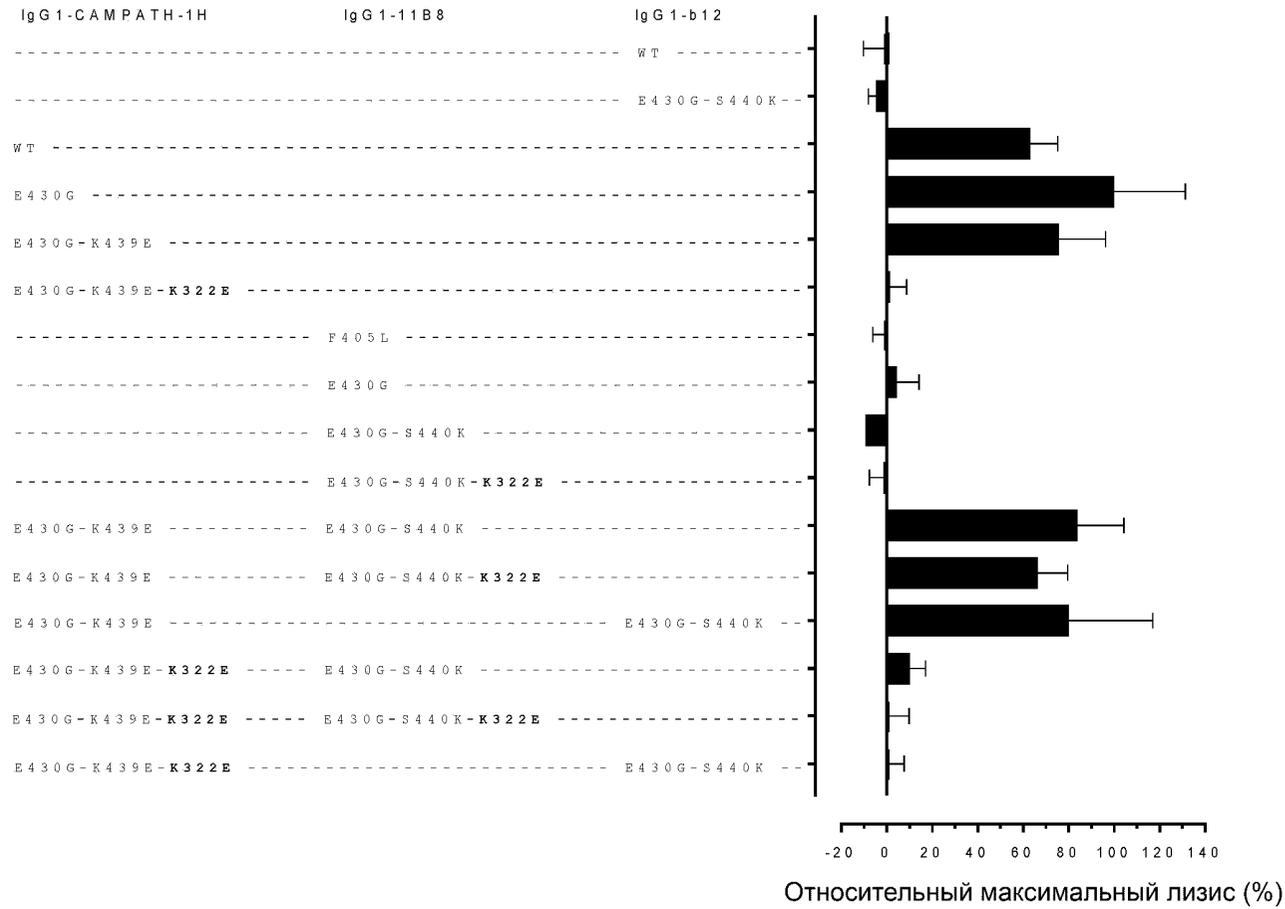


6/92

Фиг. 3 (ПРИЛОЖЕНИЕ)

E

CDC R E H
Смешанные варианты K322E

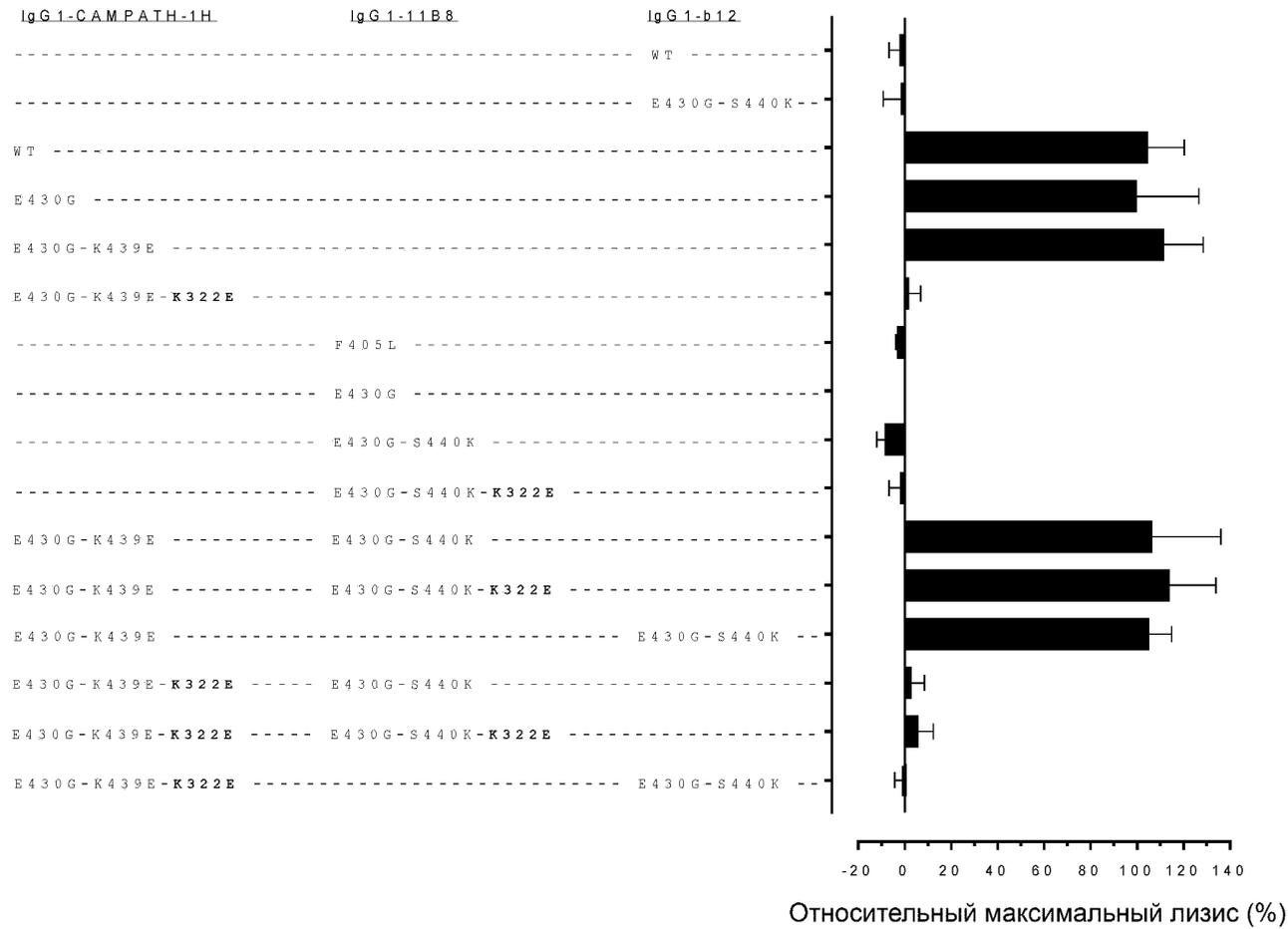


7/92

Фиг. 3 (ПРИЛОЖЕНИЕ)

F

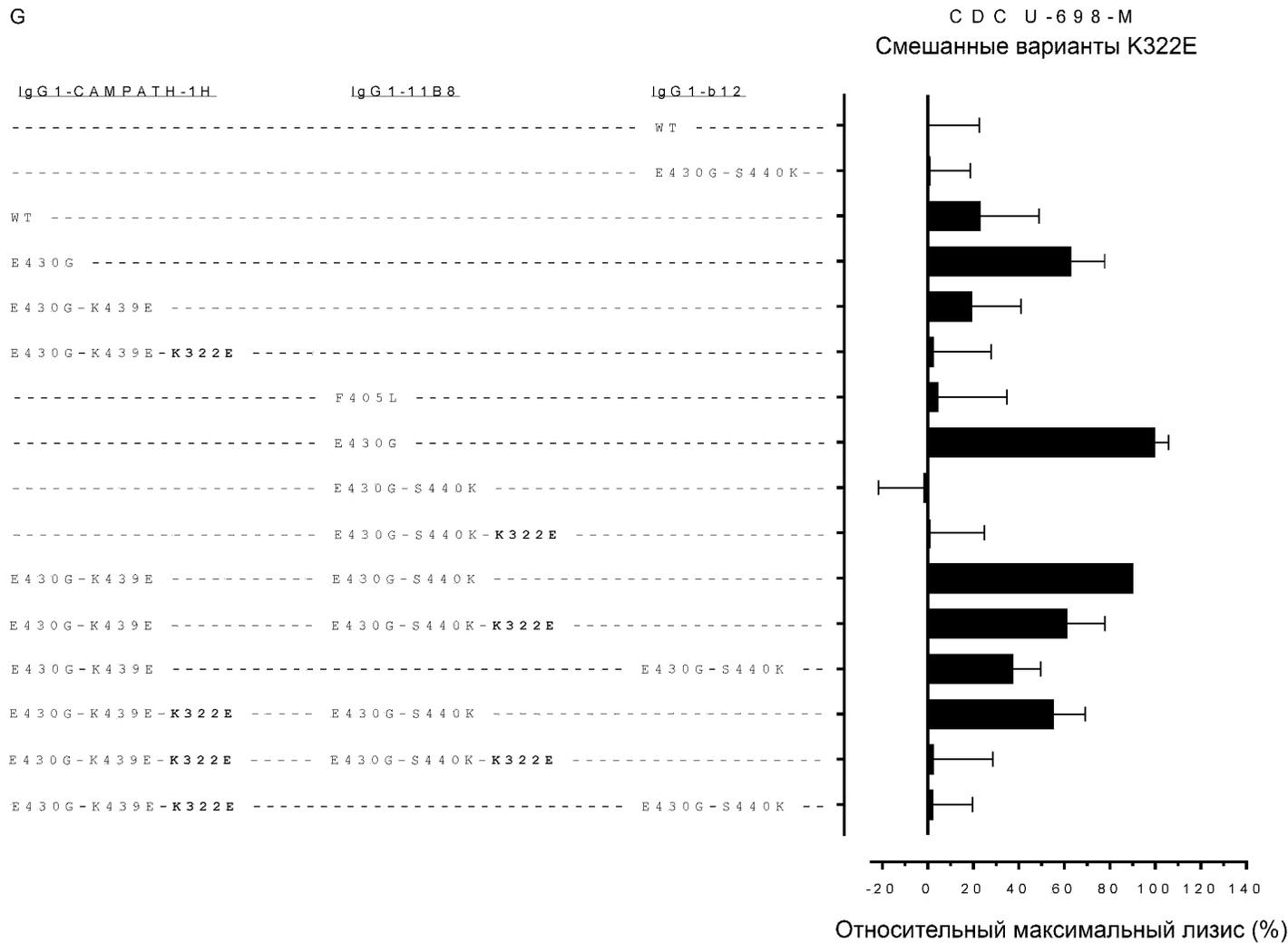
CDC U 266 B 1
Смешанные варианты K322E



8/92

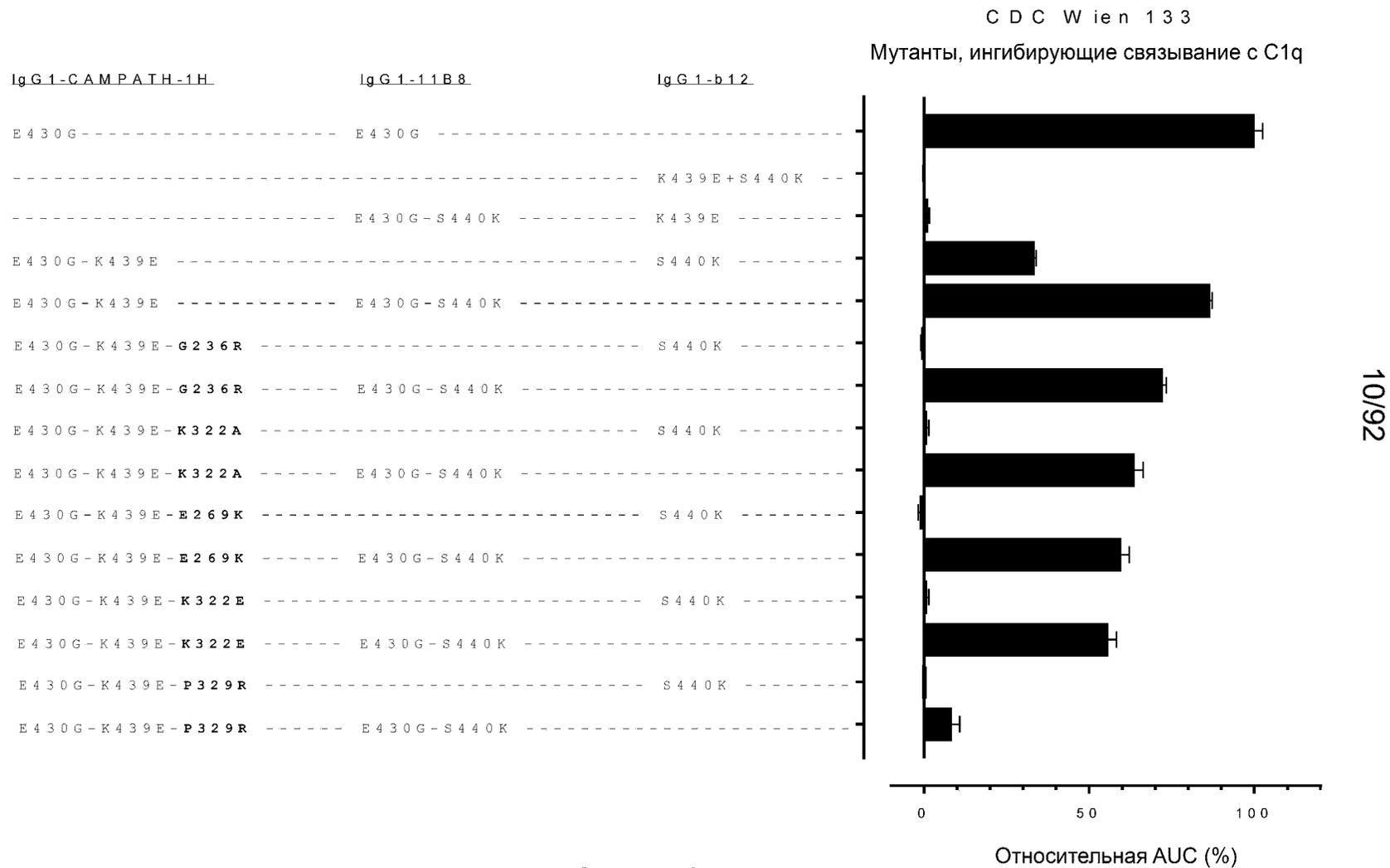
Фиг. 3 (ПРИЛОЖЕНИЕ)

G



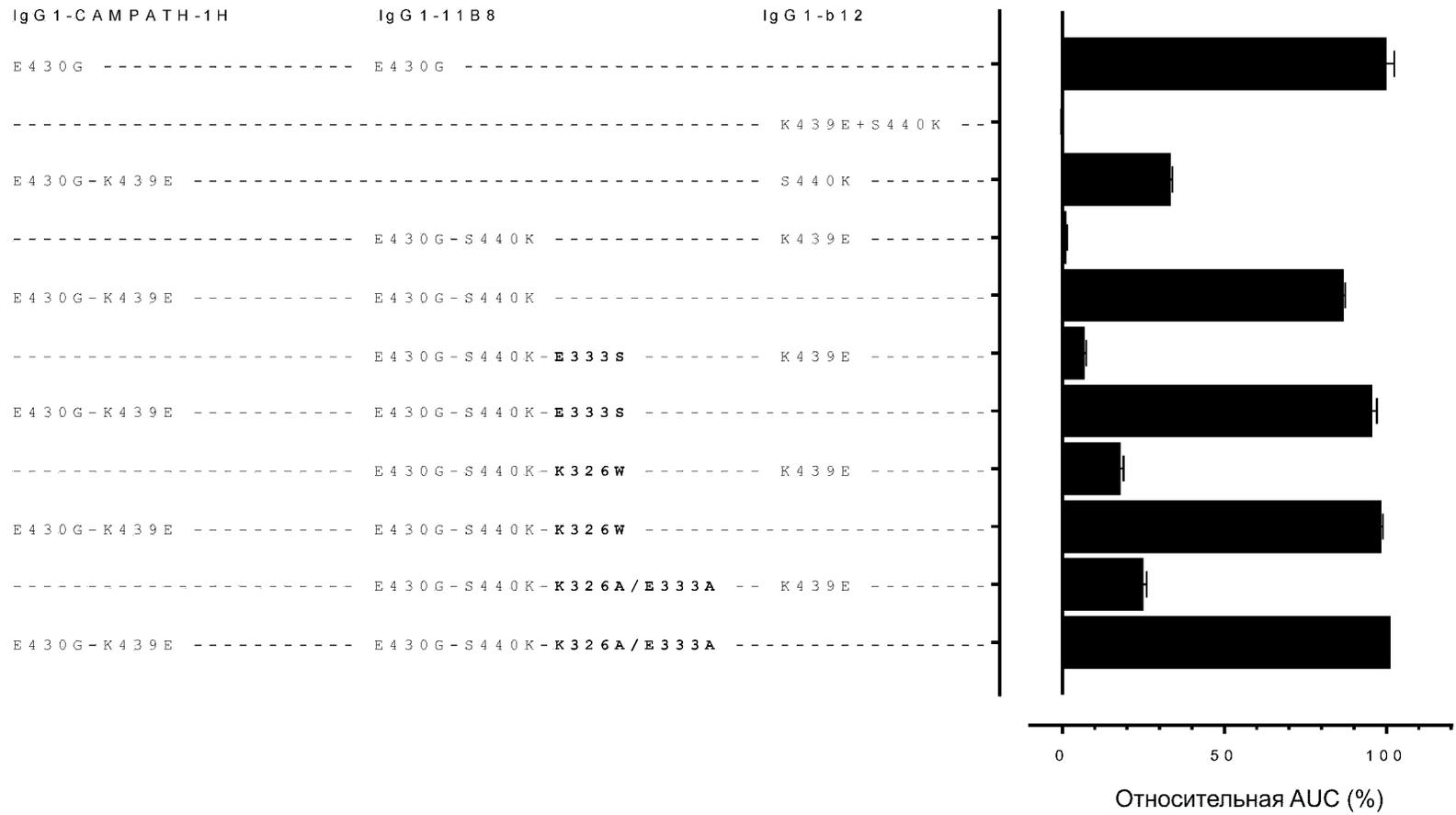
9/92

ФИГ. 3 (ПРИЛОЖЕНИЕ)



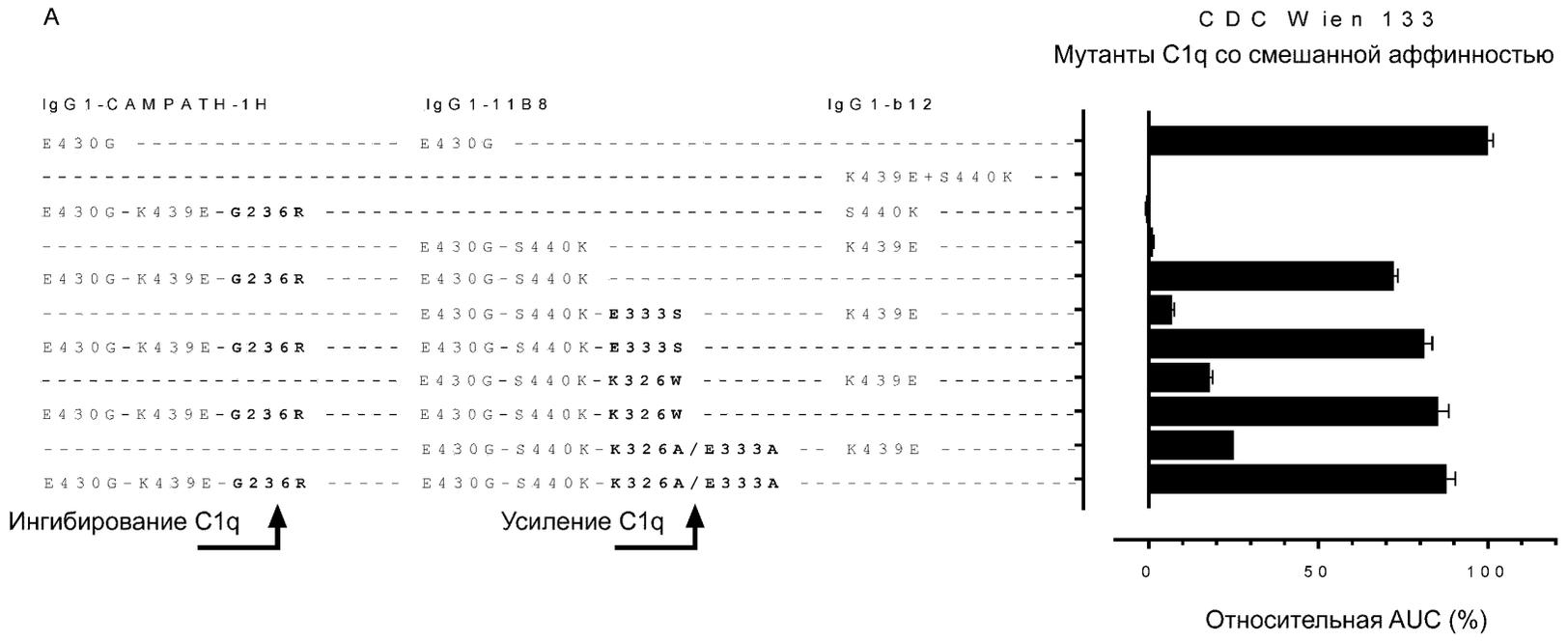
Фиг. 4

C D C W i e n 1 3 3
 Мутанты, ингибирующие связывание с C1q



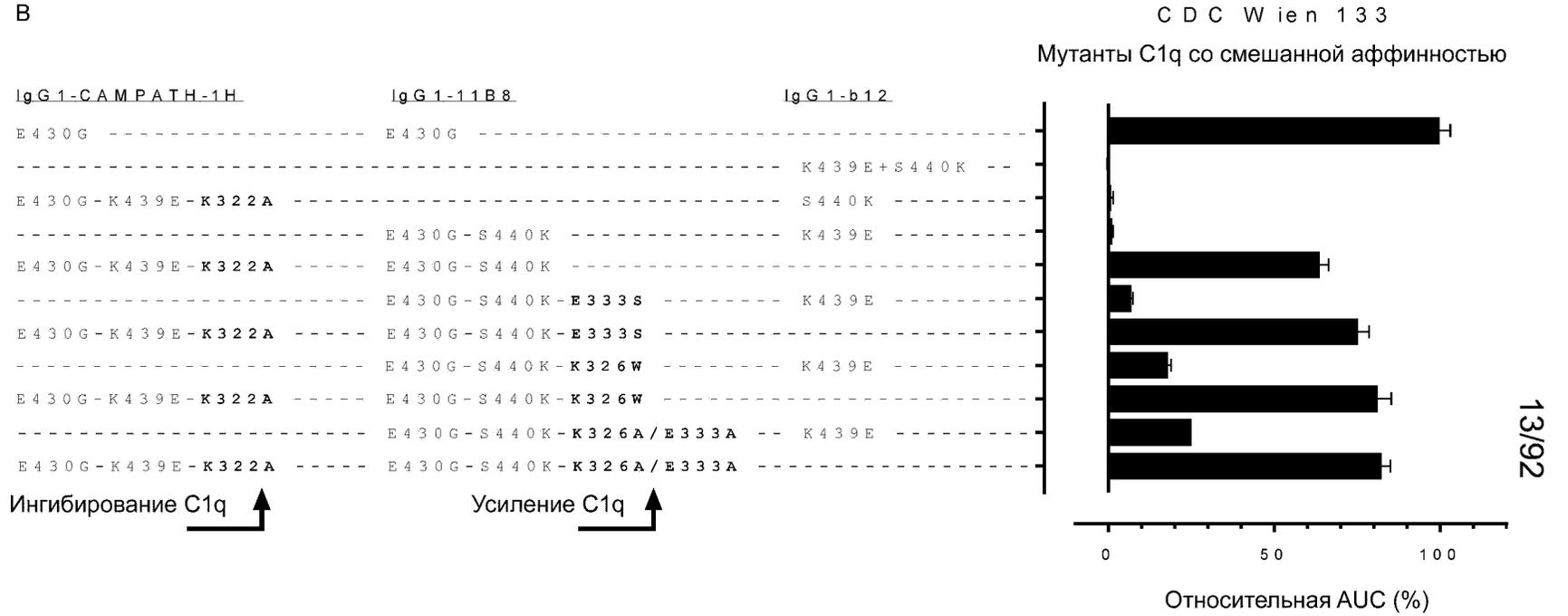
14/92

Фиг. 5

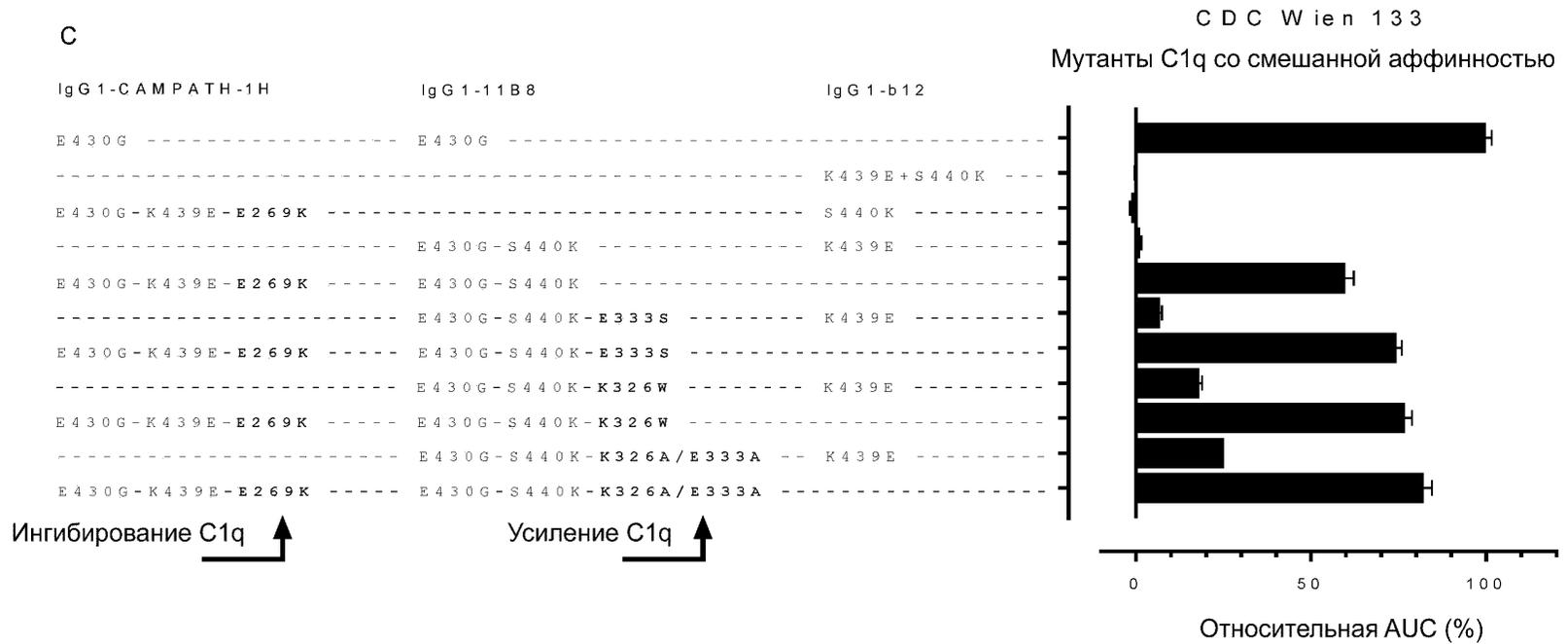


Фиг. 6

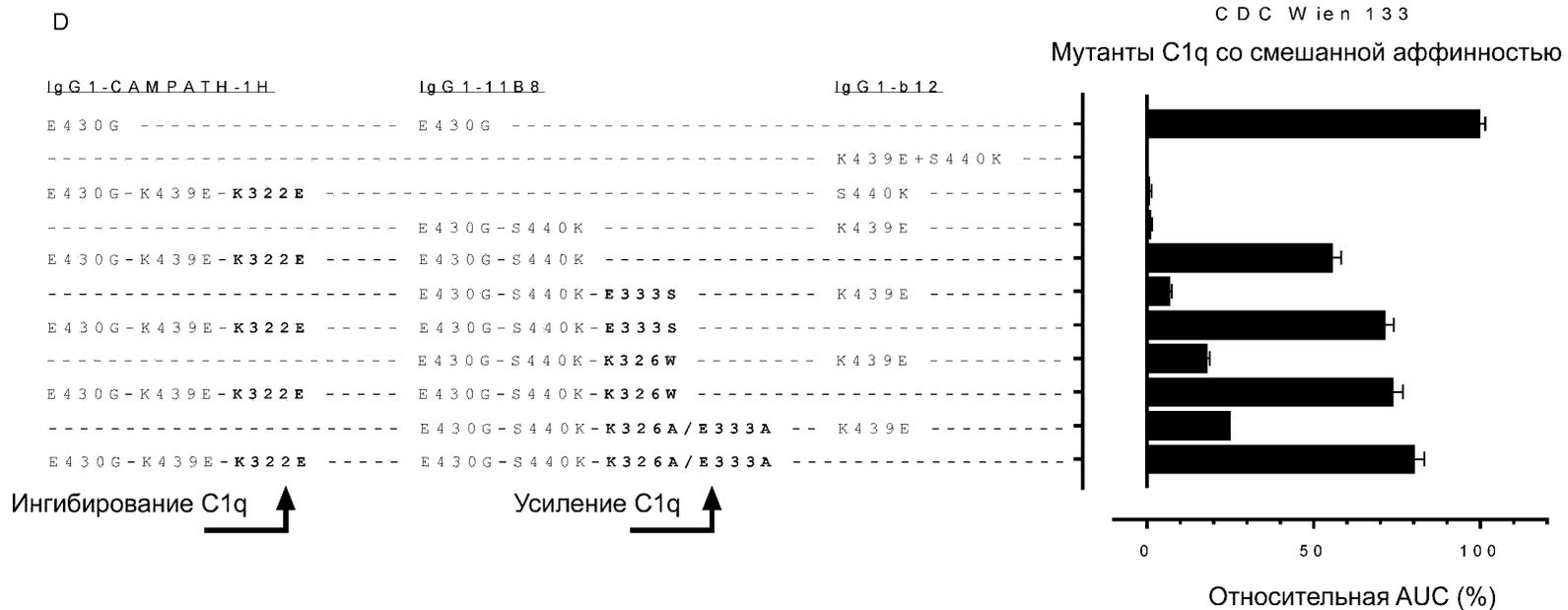
B



Фиг. 6 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

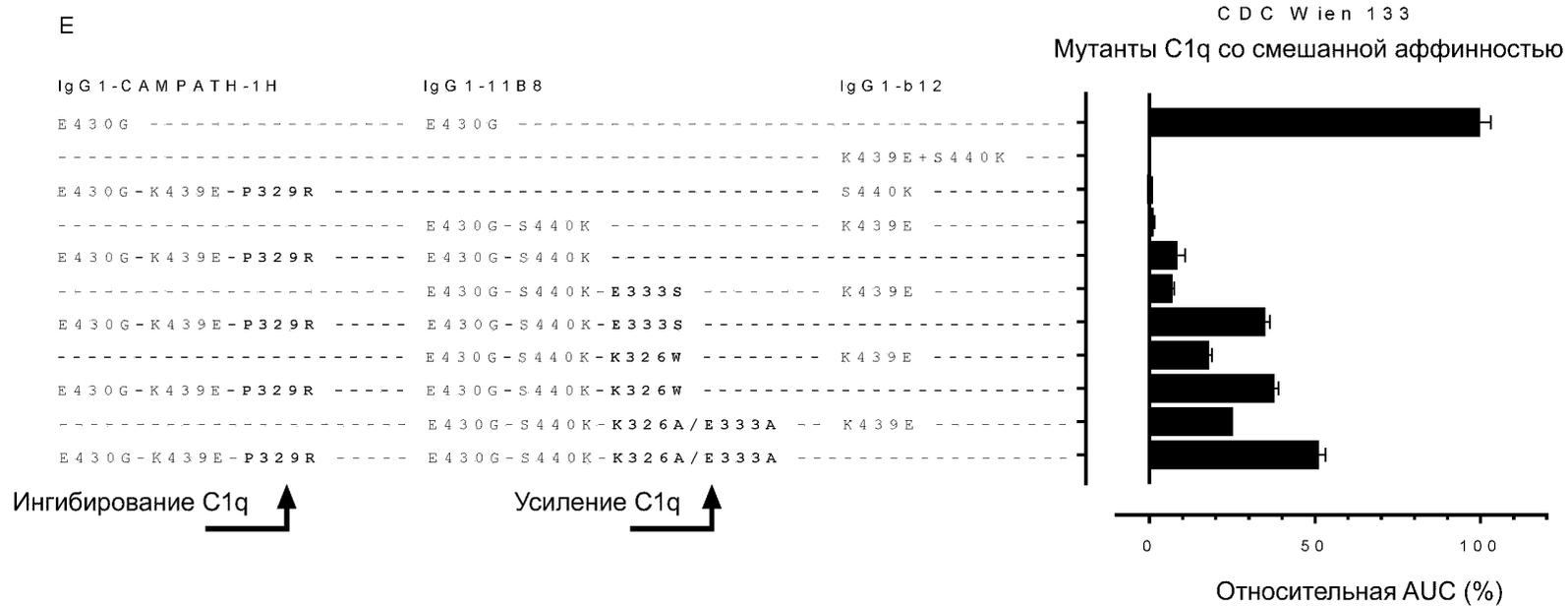


ФИГ. 6 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



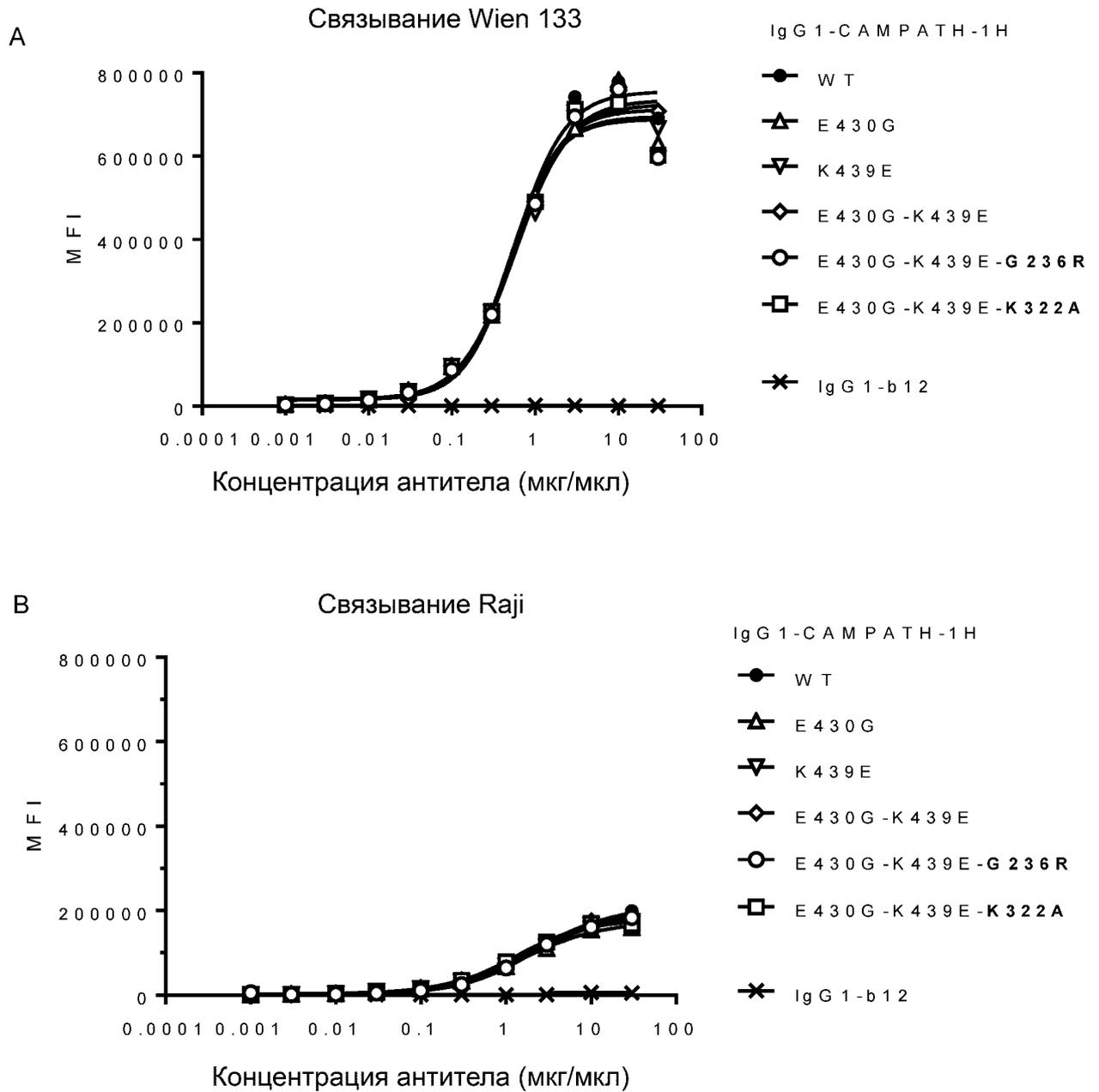
15/92

Фиг. 6 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

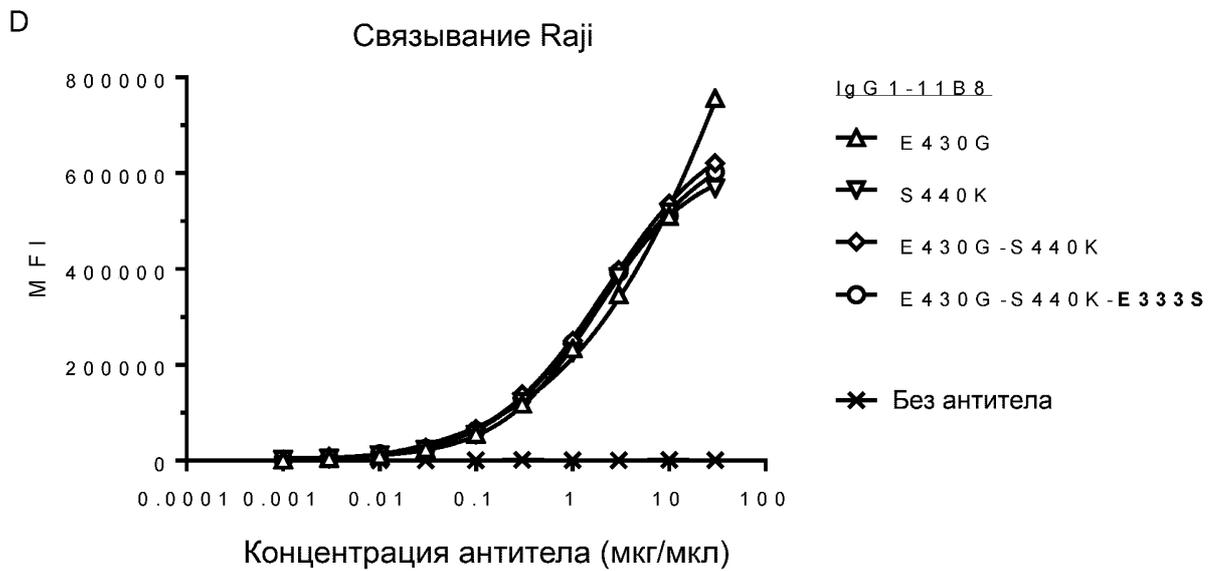
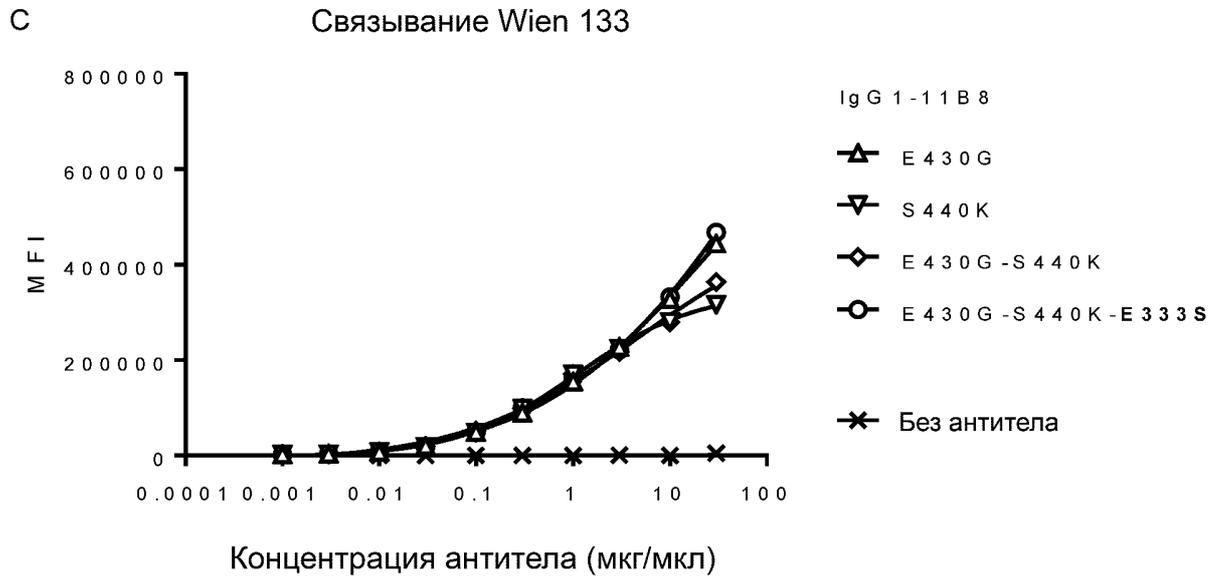


16/92

Фиг. 6 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



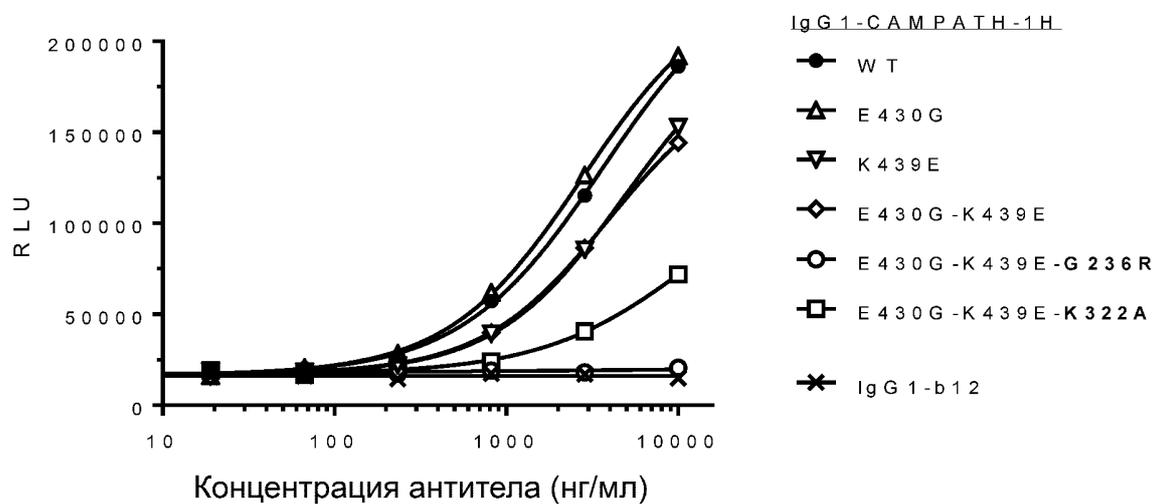
Фиг. 7



ФИГ. 7 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

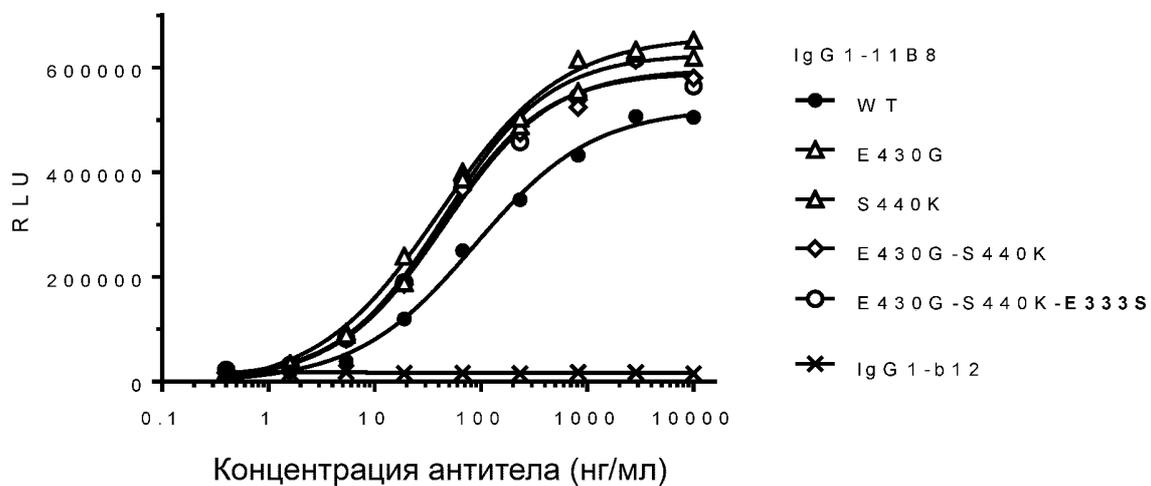
A

Репортерный биоанализ ADCC
Клетки-мишени Raji



B

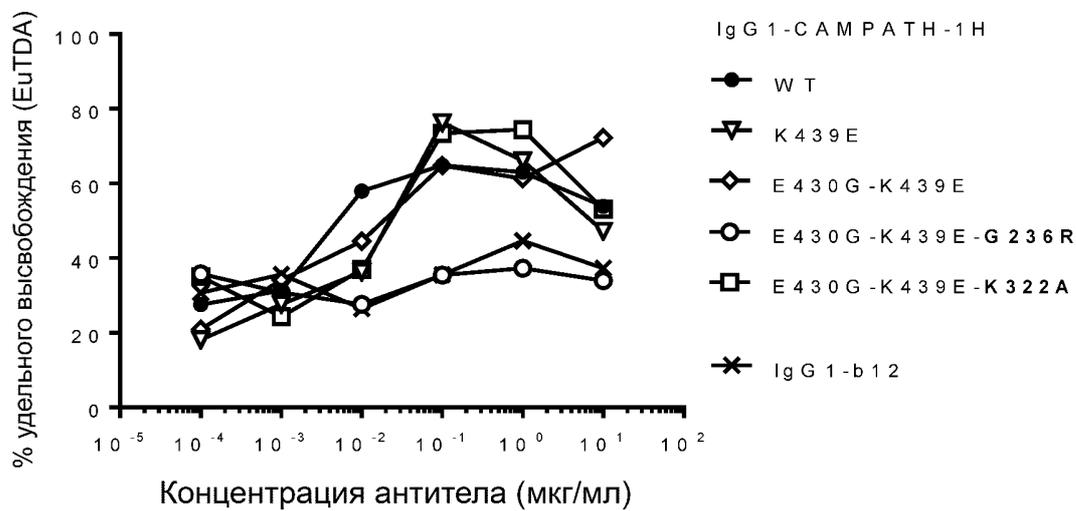
Репортерный биоанализ ADCC
Клетки-мишени Raji



Фиг. 8

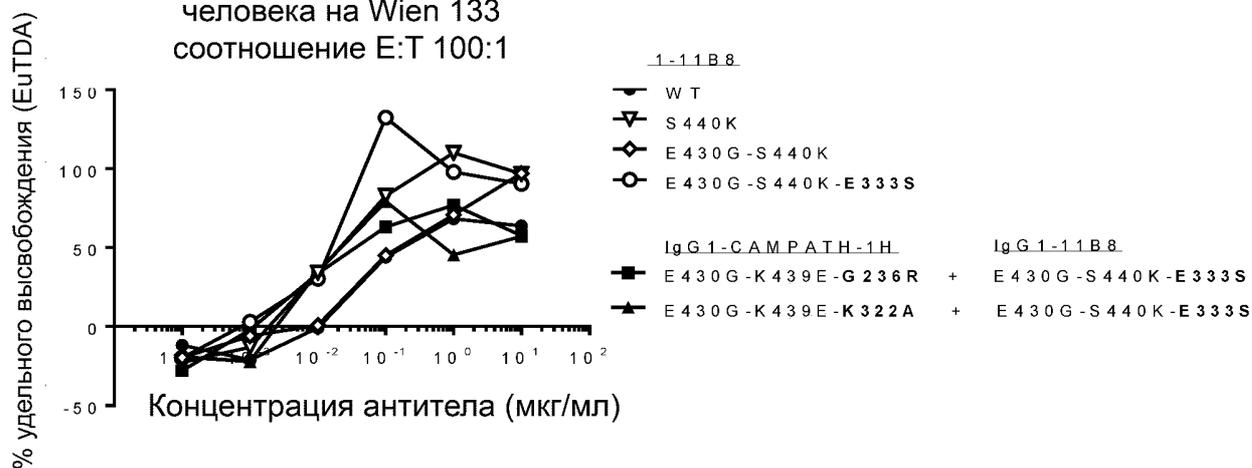
C

Анализ ADCC EuTDA PBMC
человека на Wien 133
соотношение E:T 100:1

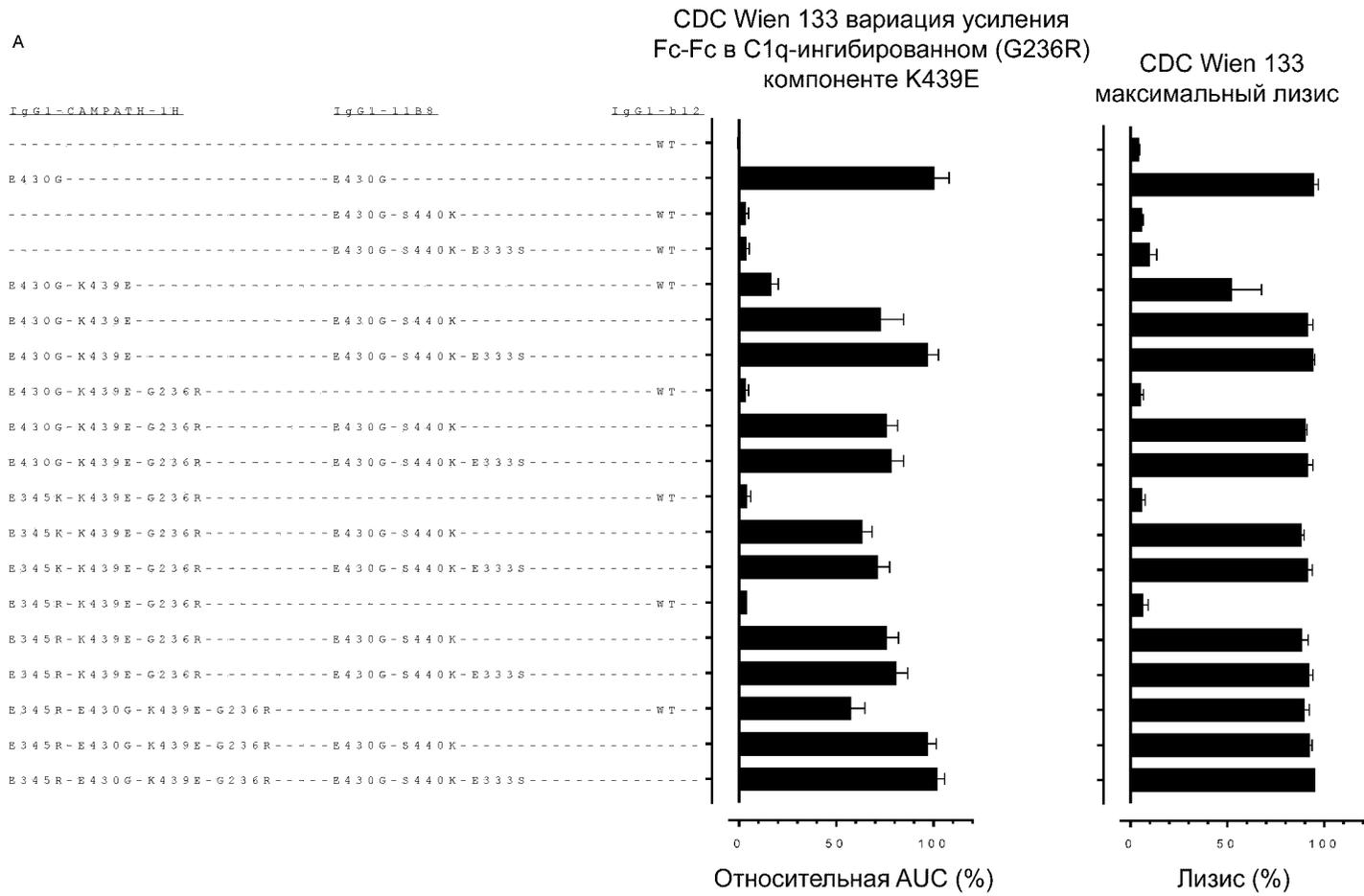


D

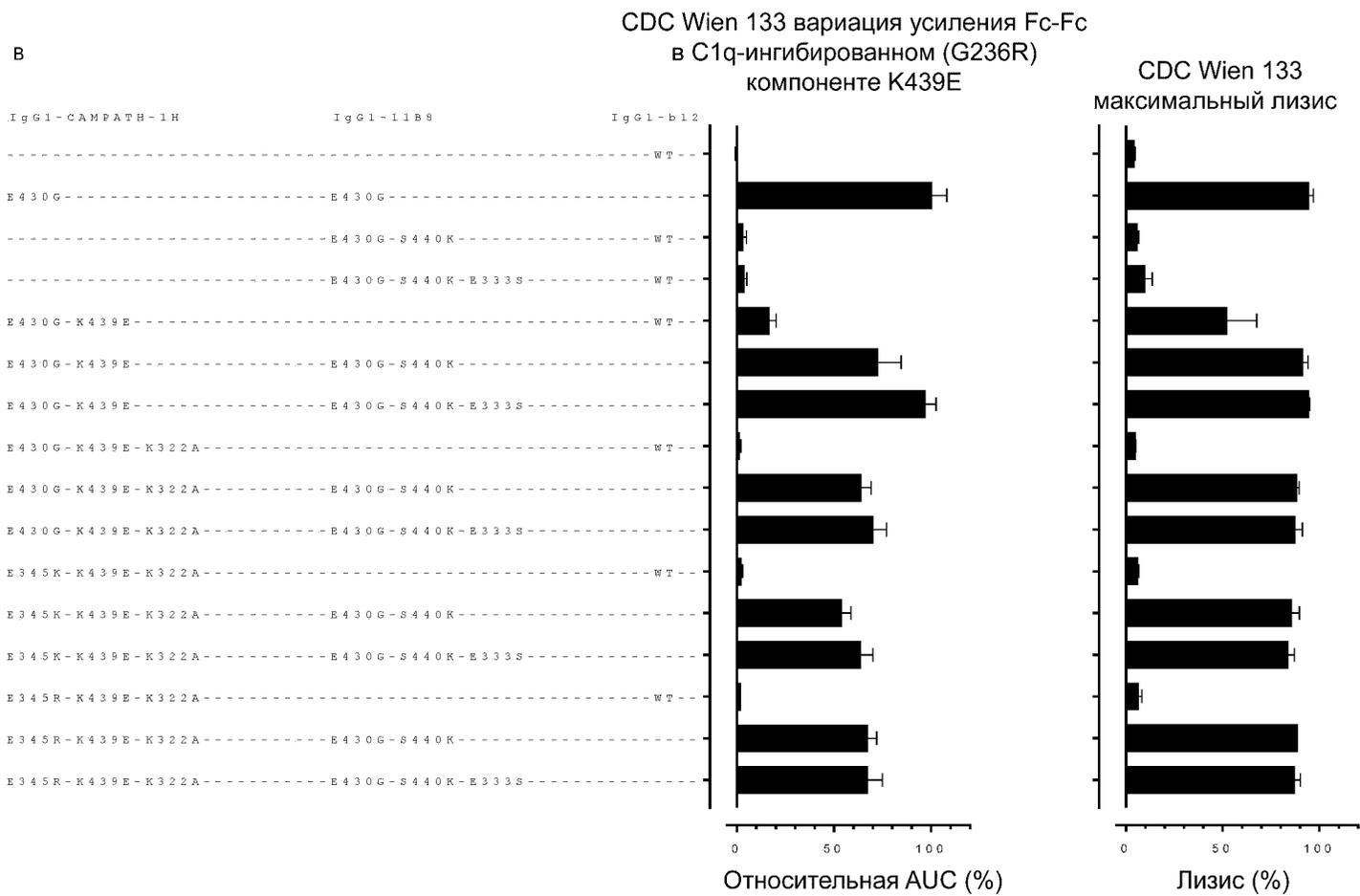
Анализ ADCC EuTDA PBMC
человека на Wien 133
соотношение E:T 100:1



ФИГ. 8 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



Фиг. 9



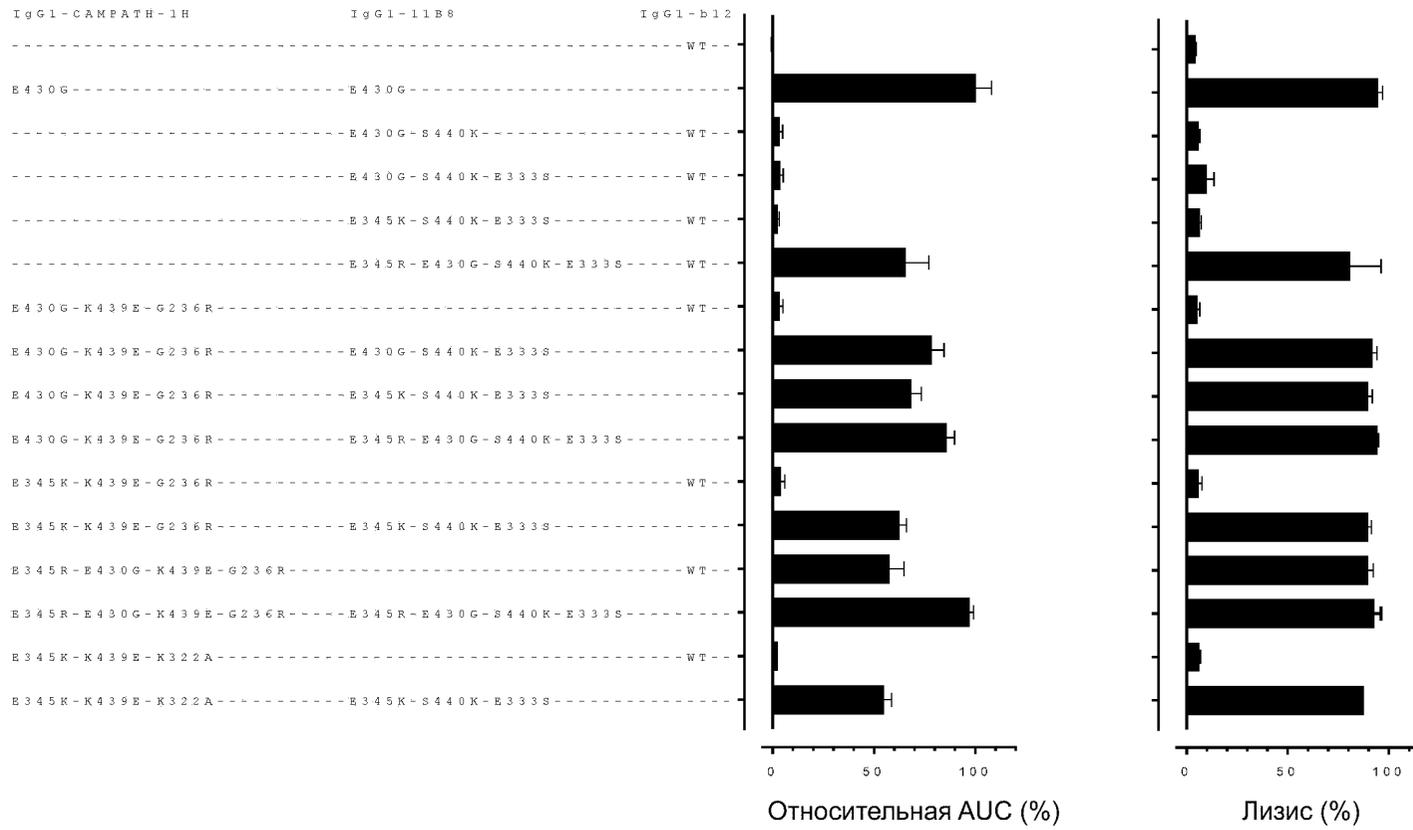
22/92

Фиг. 9 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

C

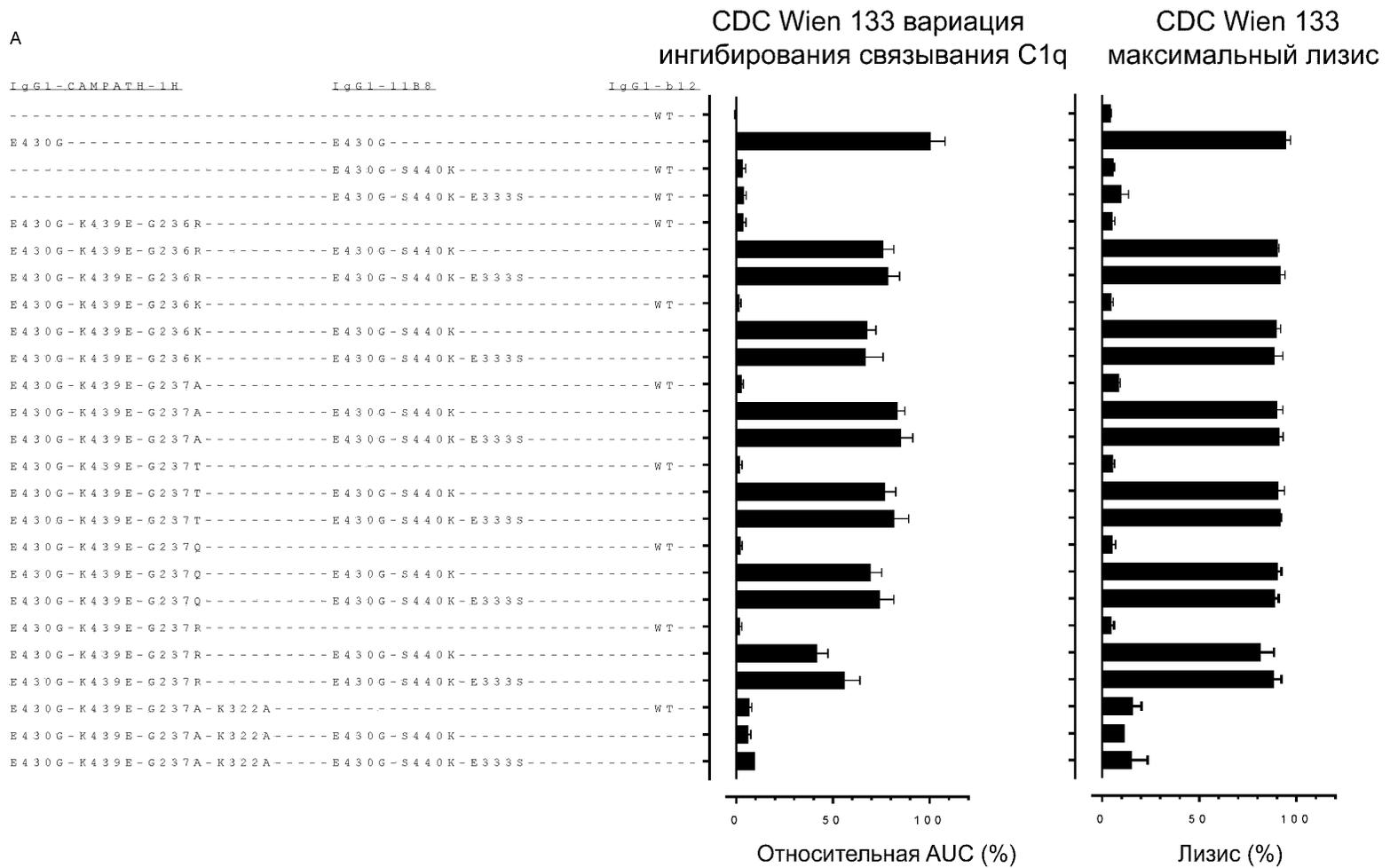
CDC Wien 133 вариация
усиления Fc-Fc в C1q-усиленном
(E333S) компоненте S440K

CDC Wien 133
максимальный лизис

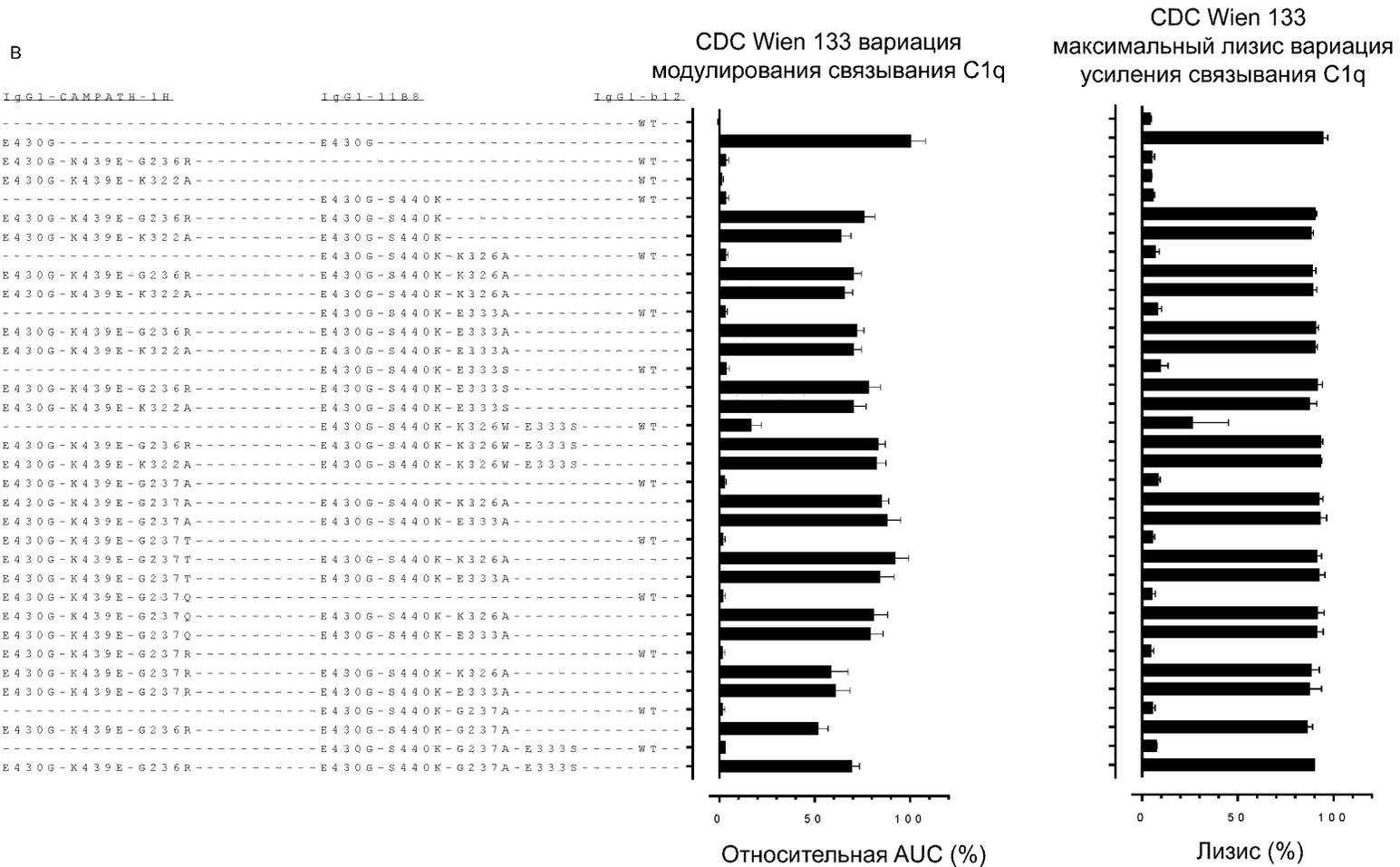


23/92

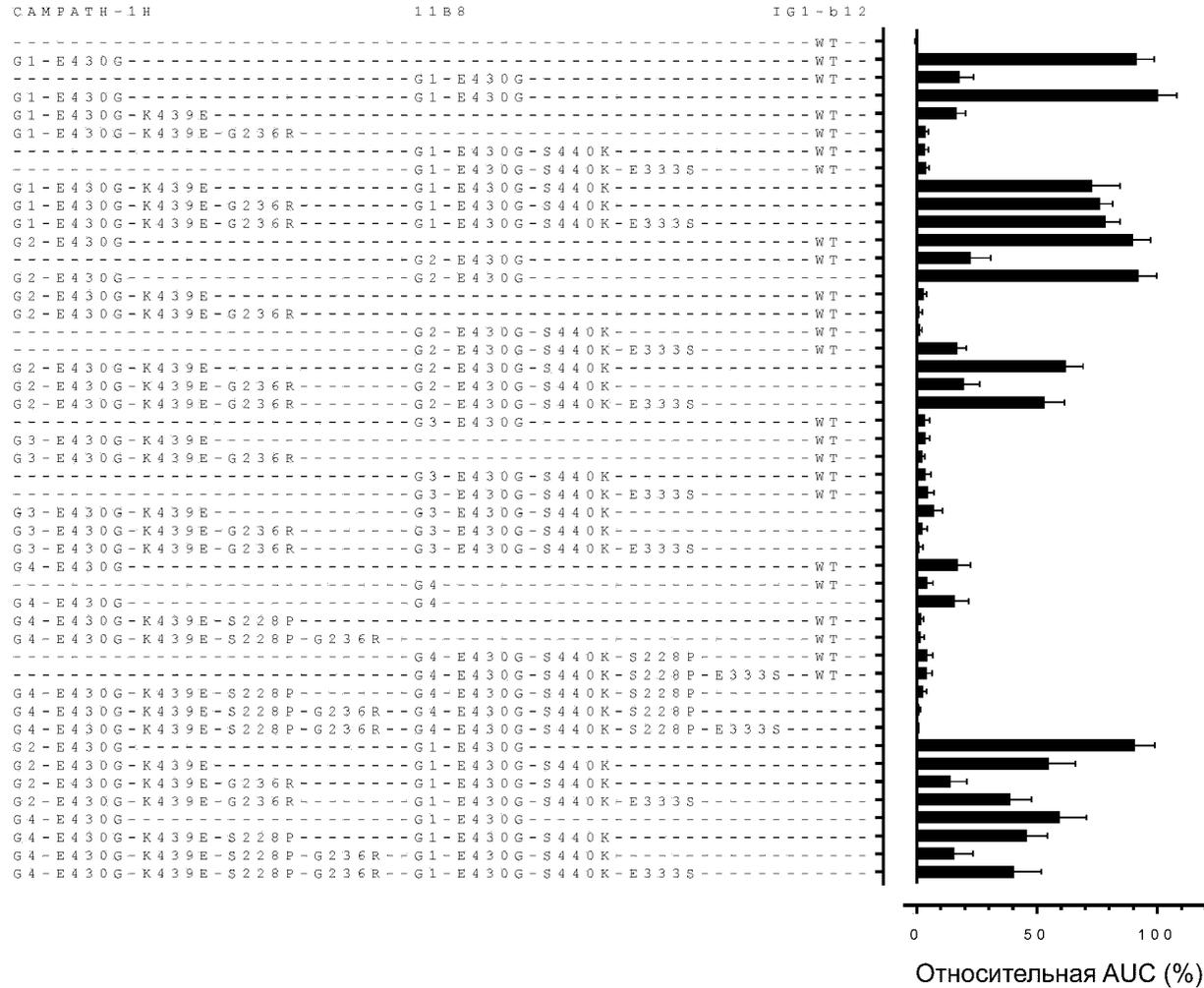
Фиг. 9 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



Фиг. 10



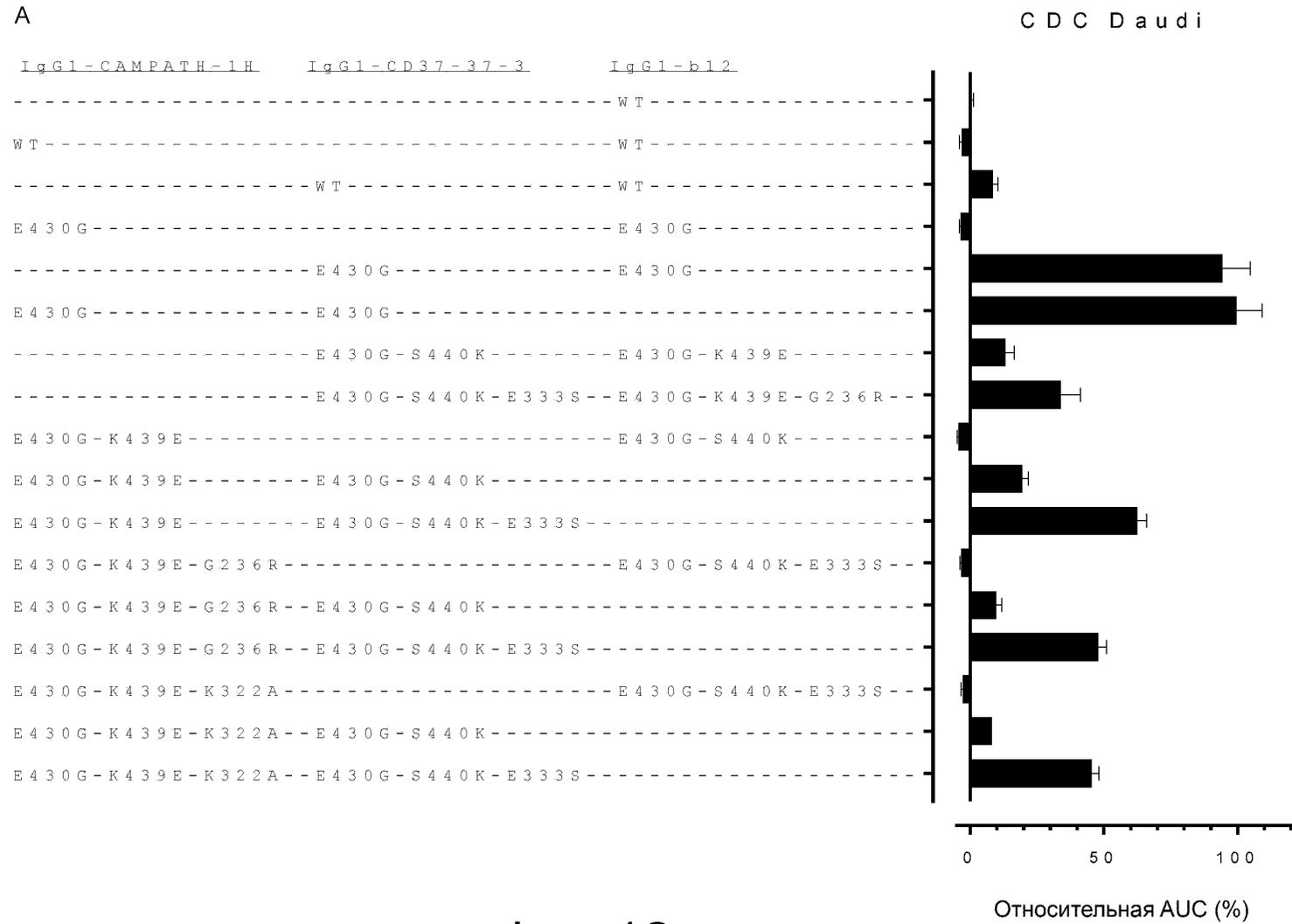
Фиг. 10 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



26/92

Фиг. 11

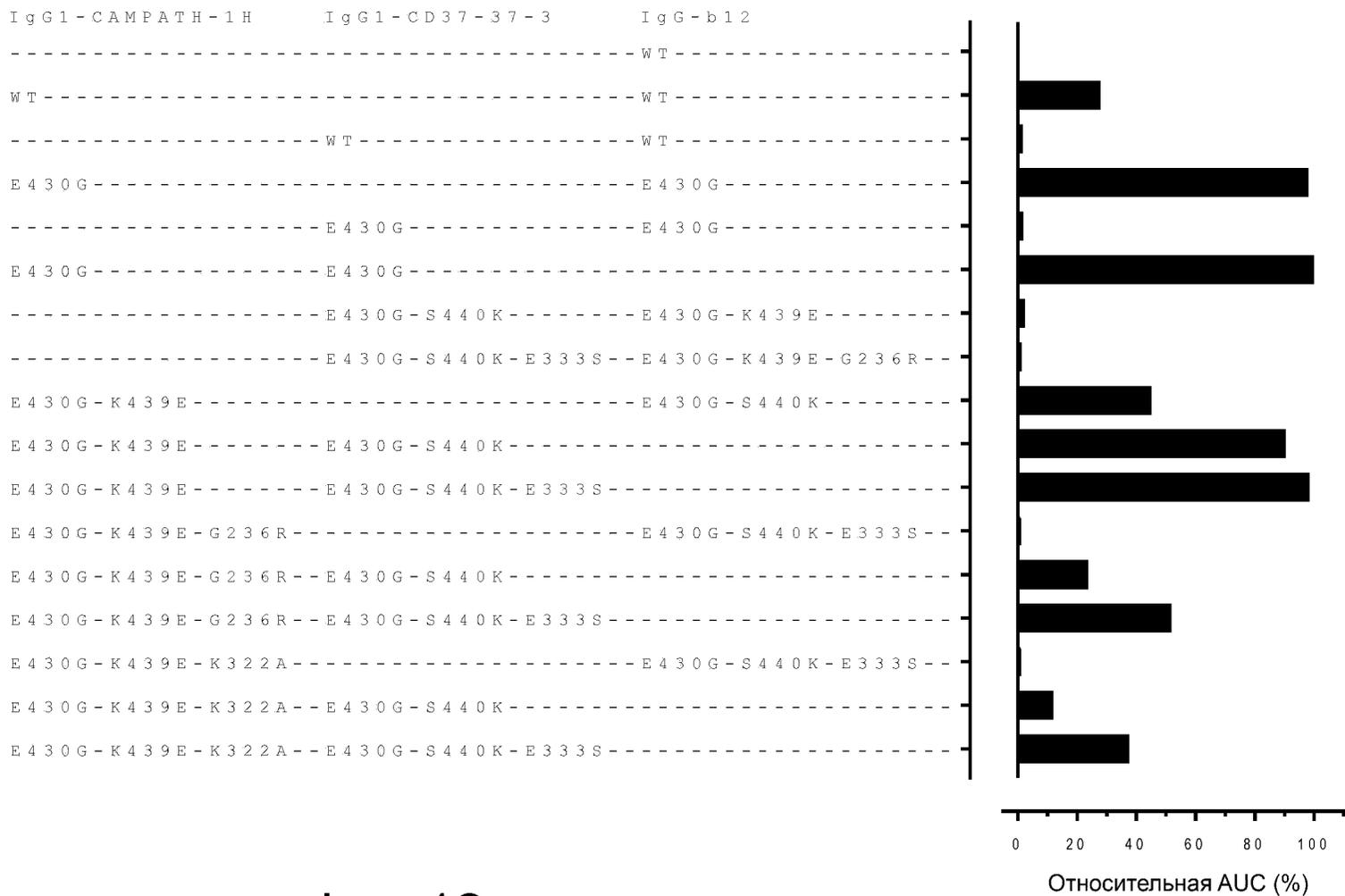
A



27/92

Фиг. 12

B



28/92

Фиг. 12 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

Анализ определения
жизнеспособности, ВхРС-3

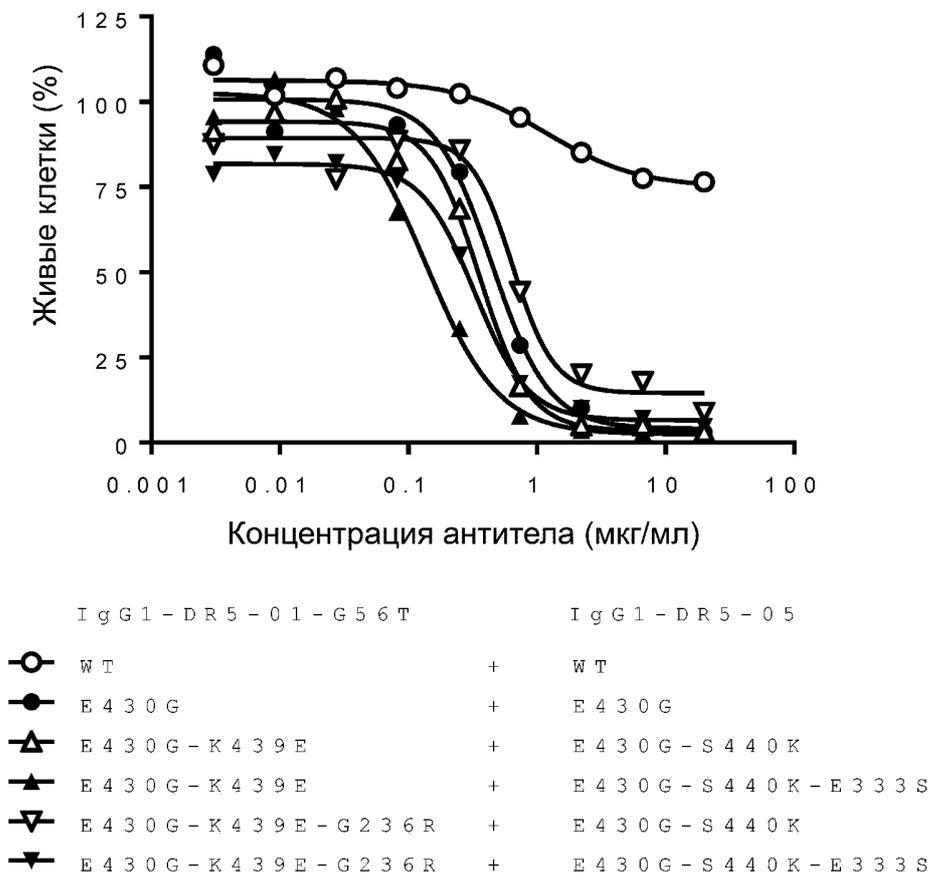
А



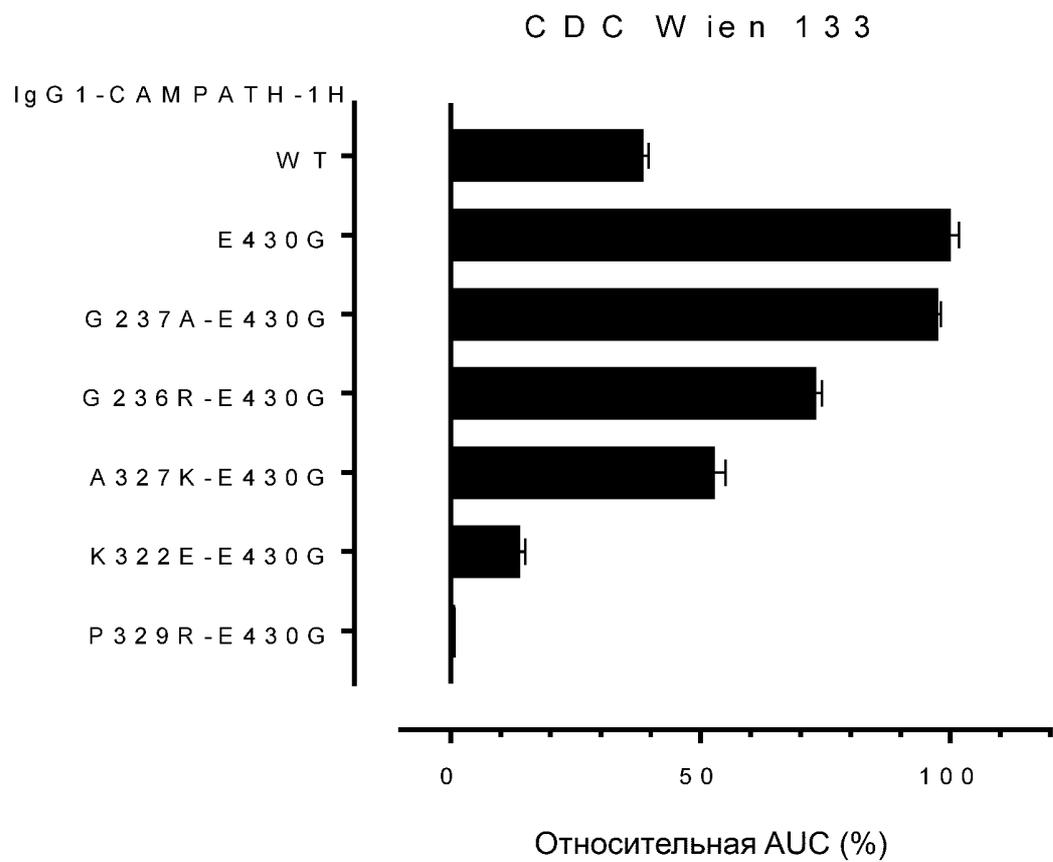
	I g G 1 - D R 5 - 0 1 - G 5 6 T	I g G 1 - D R 5 - 0 5	I g G 1 - b 1 2
✱	-----	-----	WT-----
●	E 4 3 0 G-----	-----	E 4 3 0 G-----
▲	E 4 3 0 G - K 4 3 9 E-----	-----	E 4 3 0 G - S 4 4 0 K-----
▼	E 4 3 0 G - K 4 3 9 E - G 2 3 6 R-----	-----	E 4 3 0 G - S 4 4 0 K - E 3 3 3 S-----
○	-----	E 4 3 0 G-----	E 4 3 0 G-----
△	-----	E 4 3 0 G - S 4 4 0 K-----	E 4 3 0 G - K 4 3 9 E-----
▽	-----	E 4 3 0 G - S 4 4 0 K - E 3 3 3 S-----	E 4 3 0 G - K 4 3 9 E - G 2 3 6 R-----

Фиг. 13

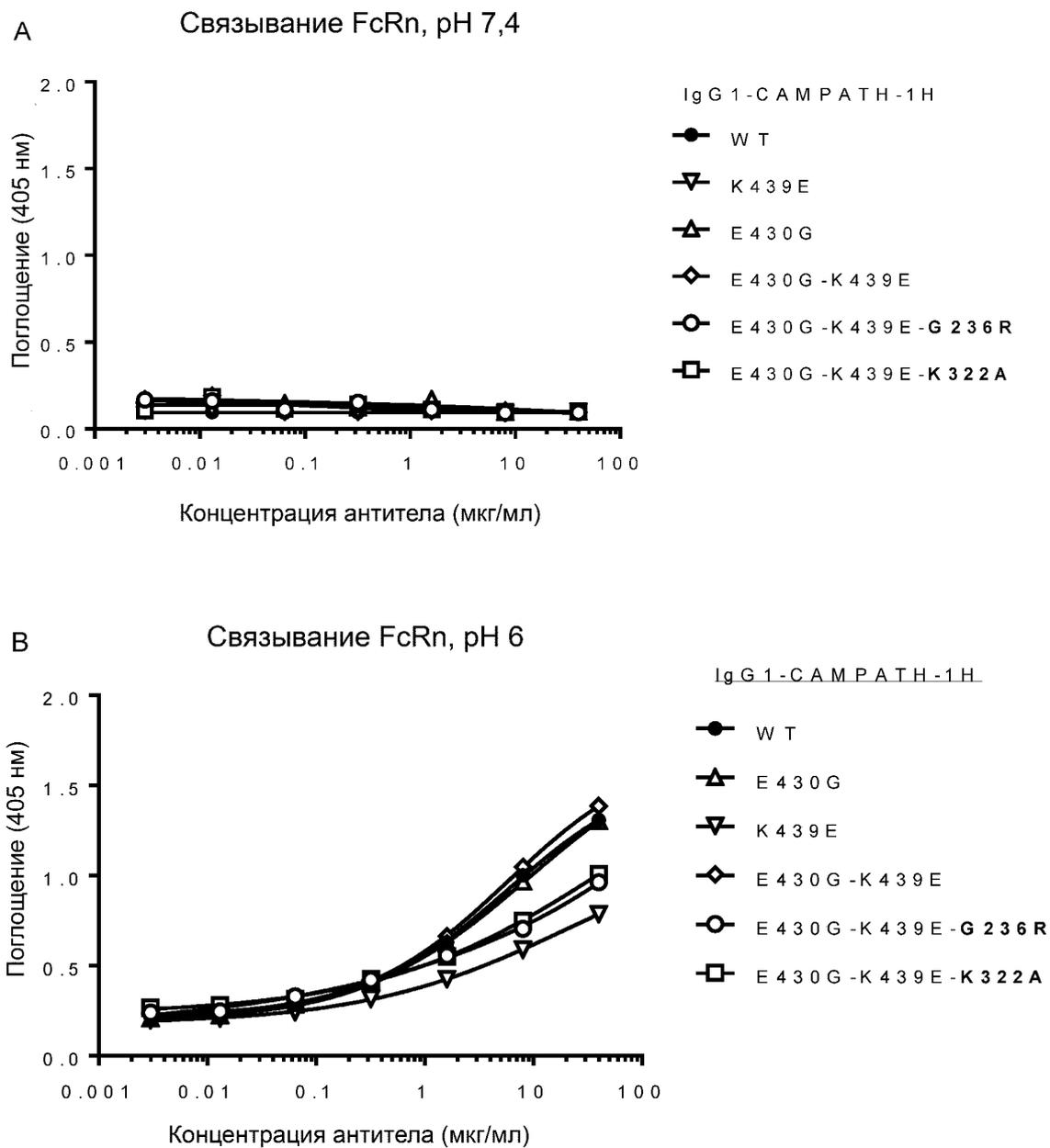
В Анализ определения жизнеспособности, ВхРС-3



Фиг. 13 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



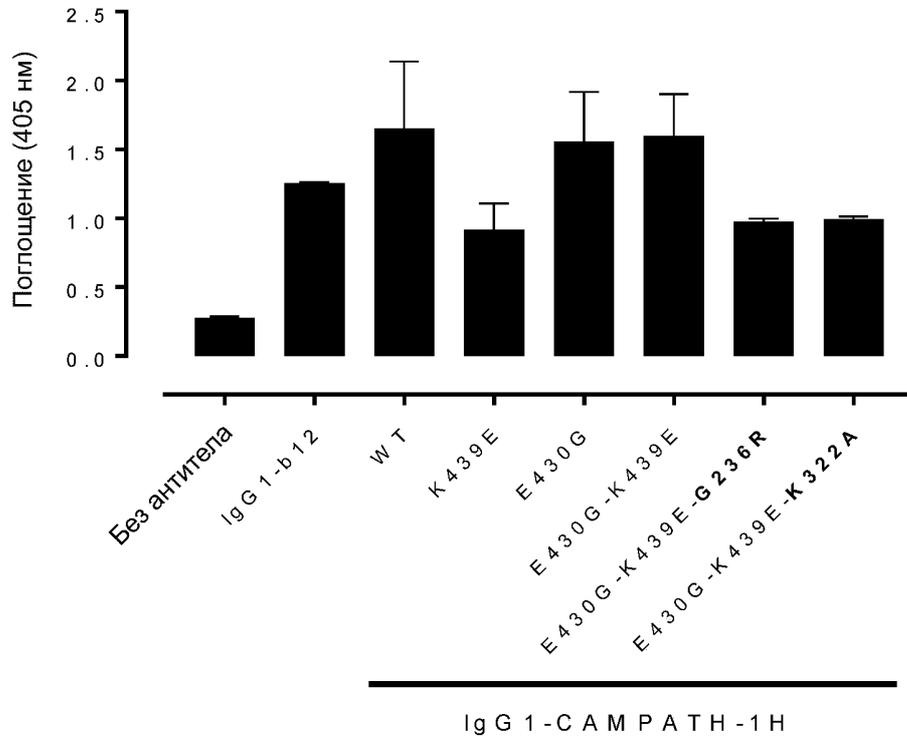
Фиг. 14



Фиг. 15

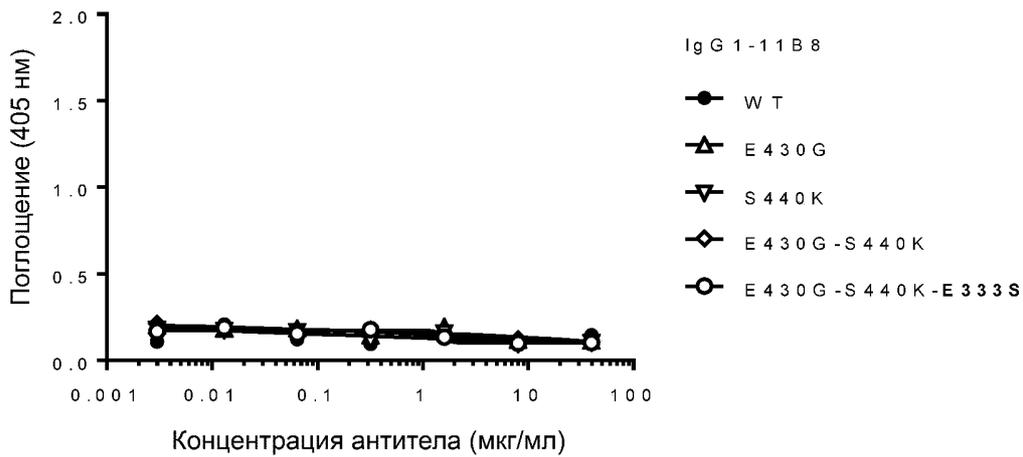
C

Связывание FcRn, pH 6, 40 мкг/мл вариантов
IgG1-CAMPATH-1H

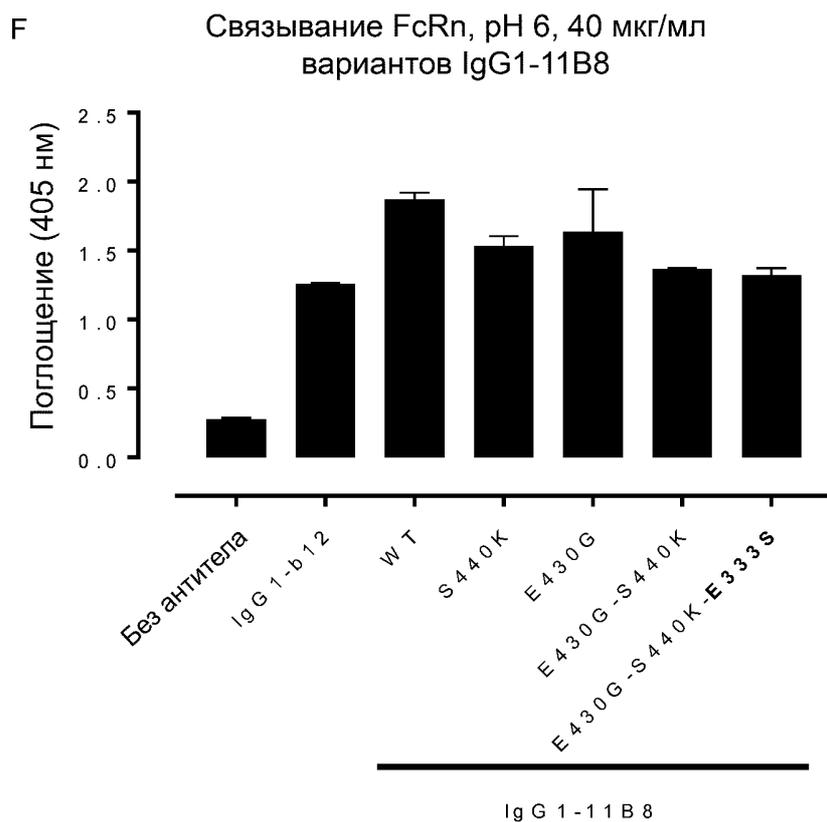
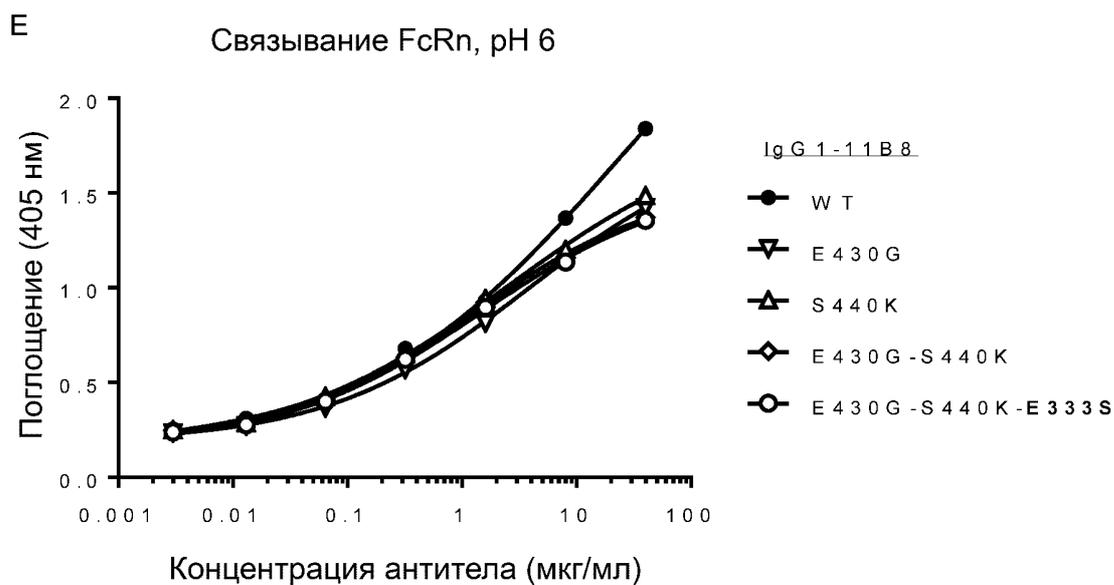


D

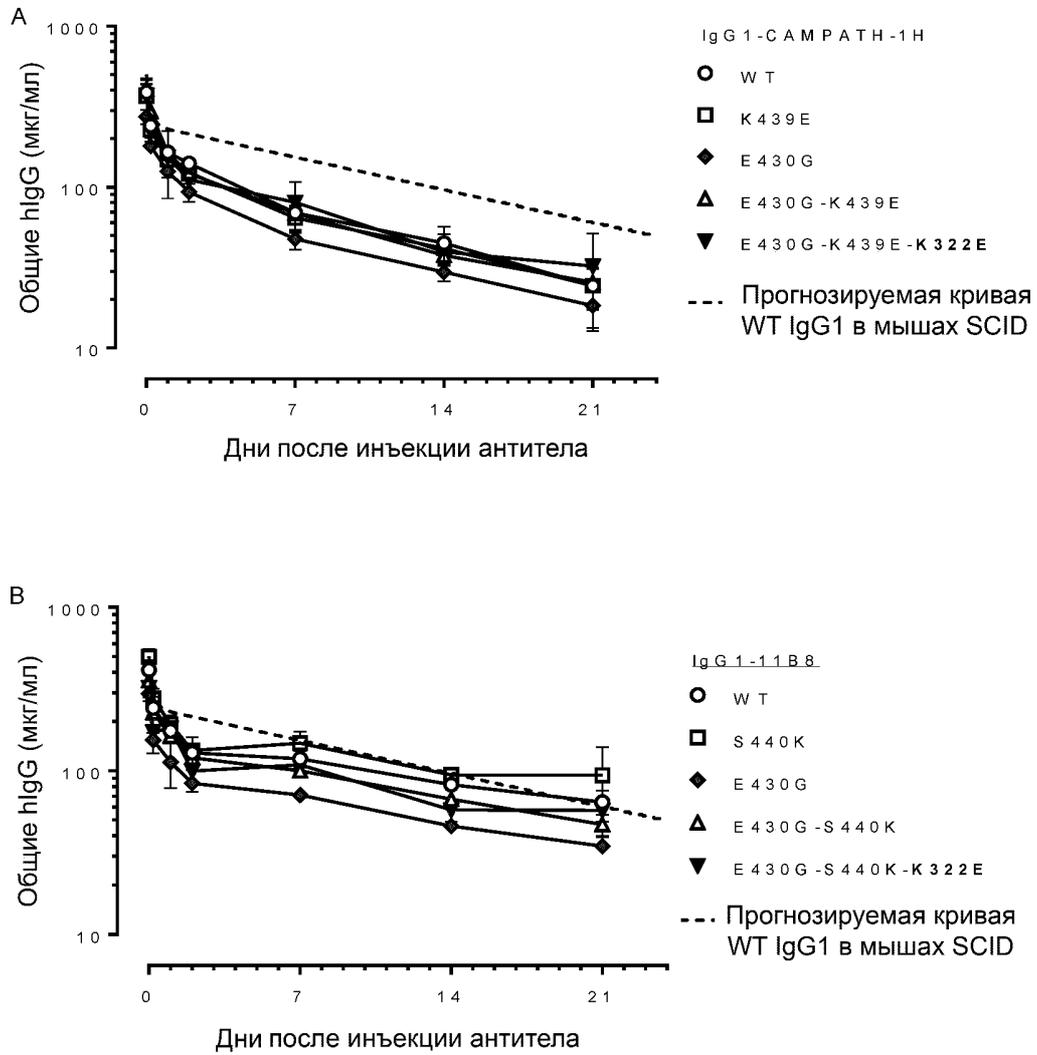
Связывание FcRn, pH 7,4



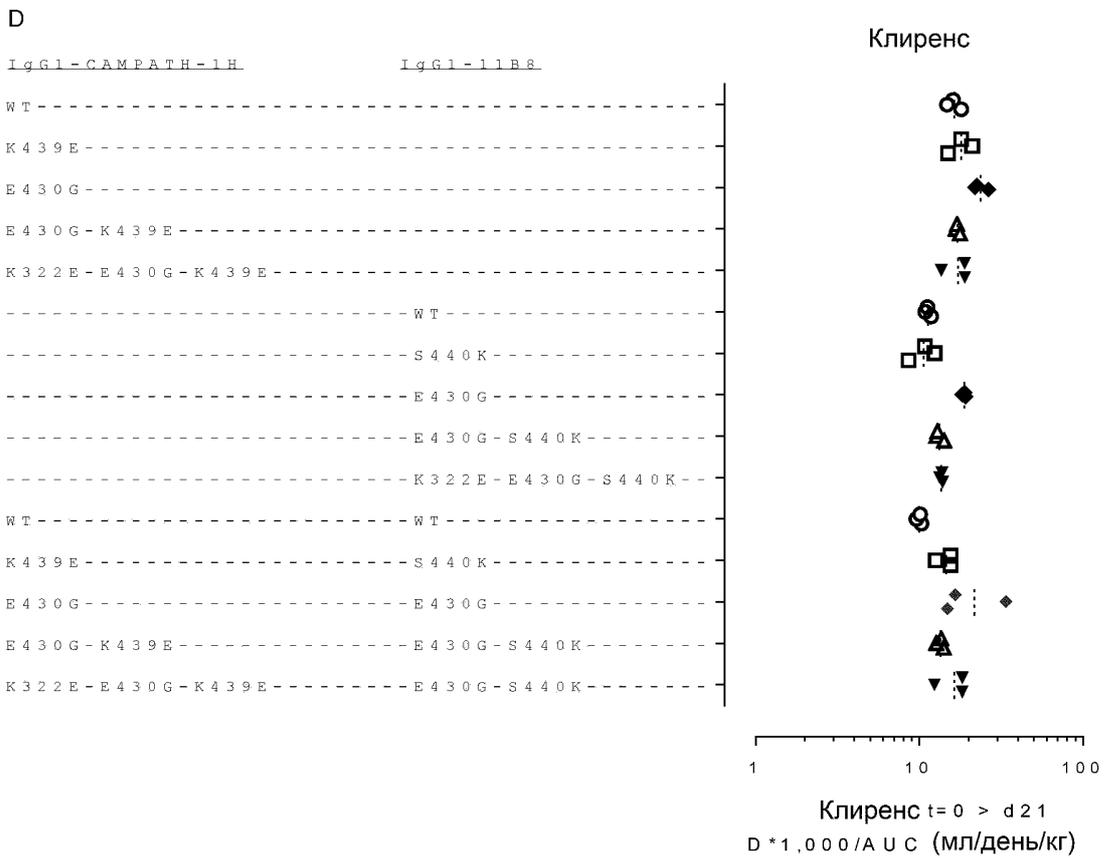
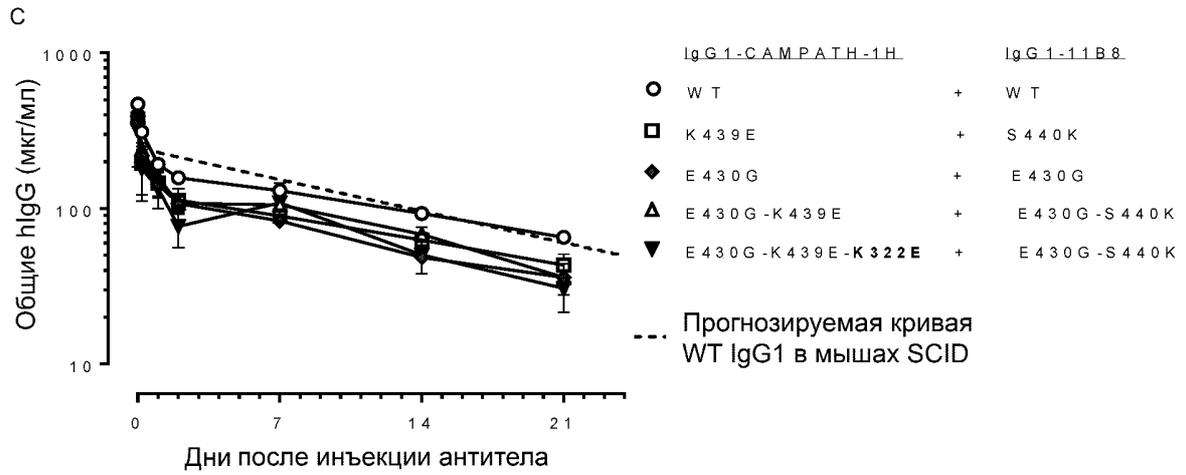
ФИГ. 15 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



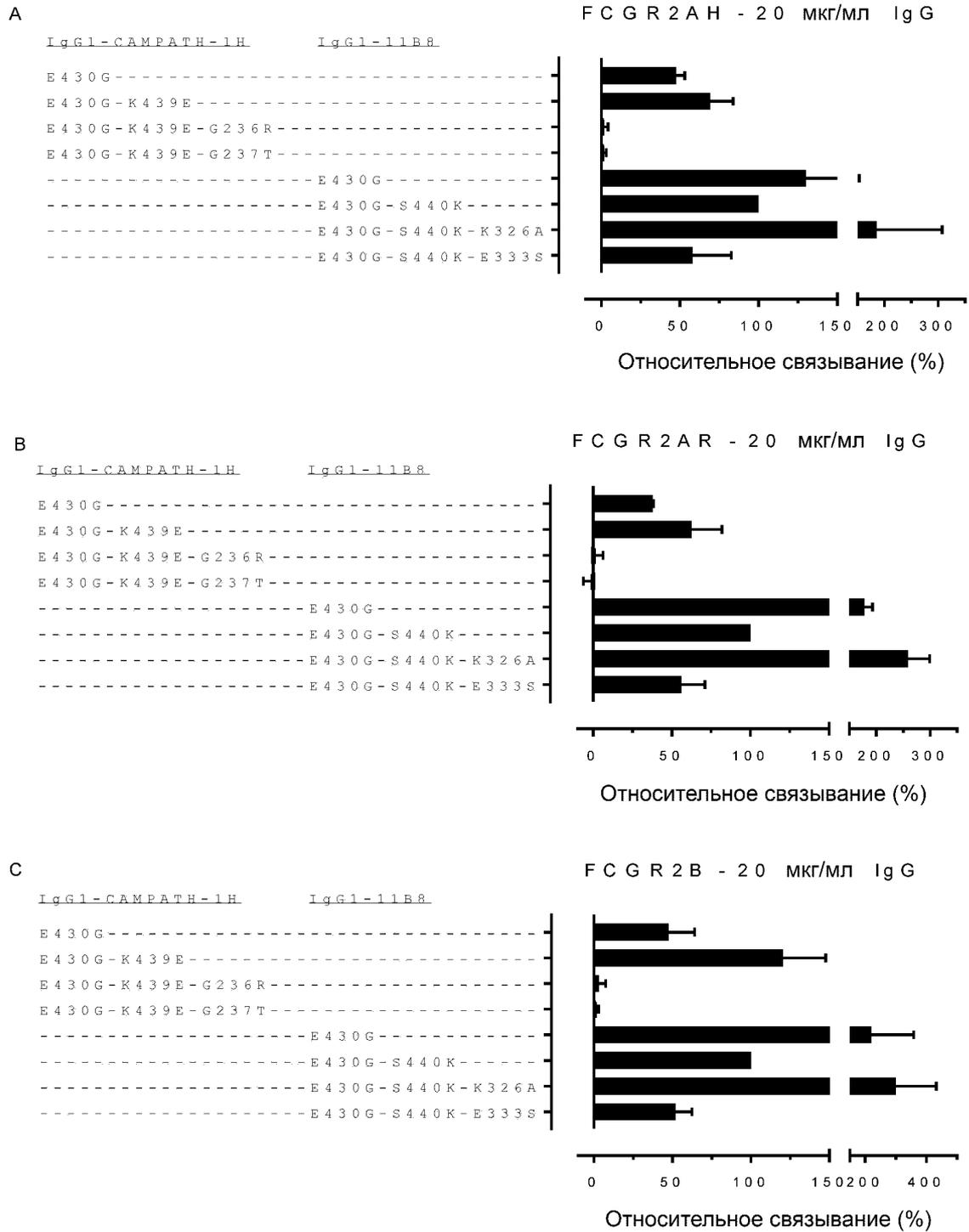
ФИГ. 15 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



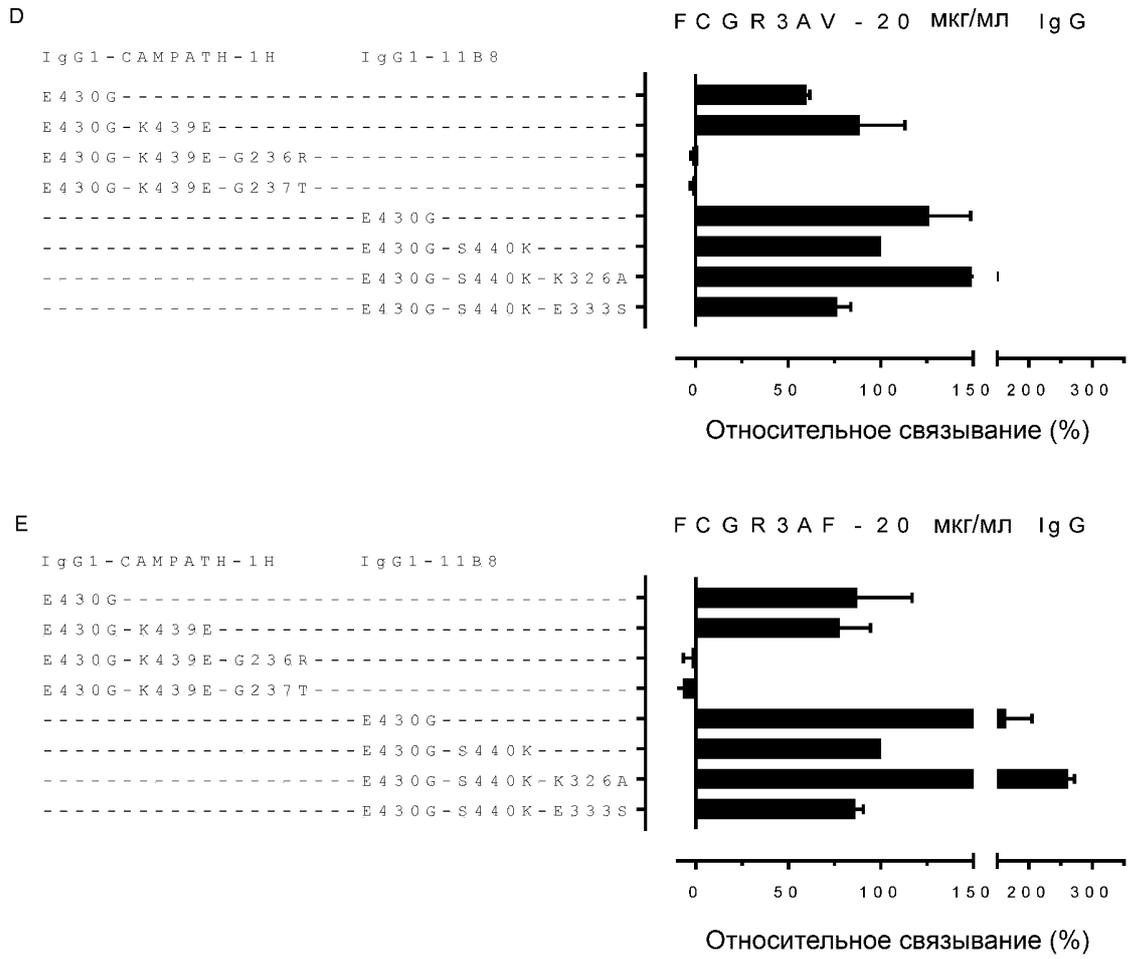
Фиг. 16



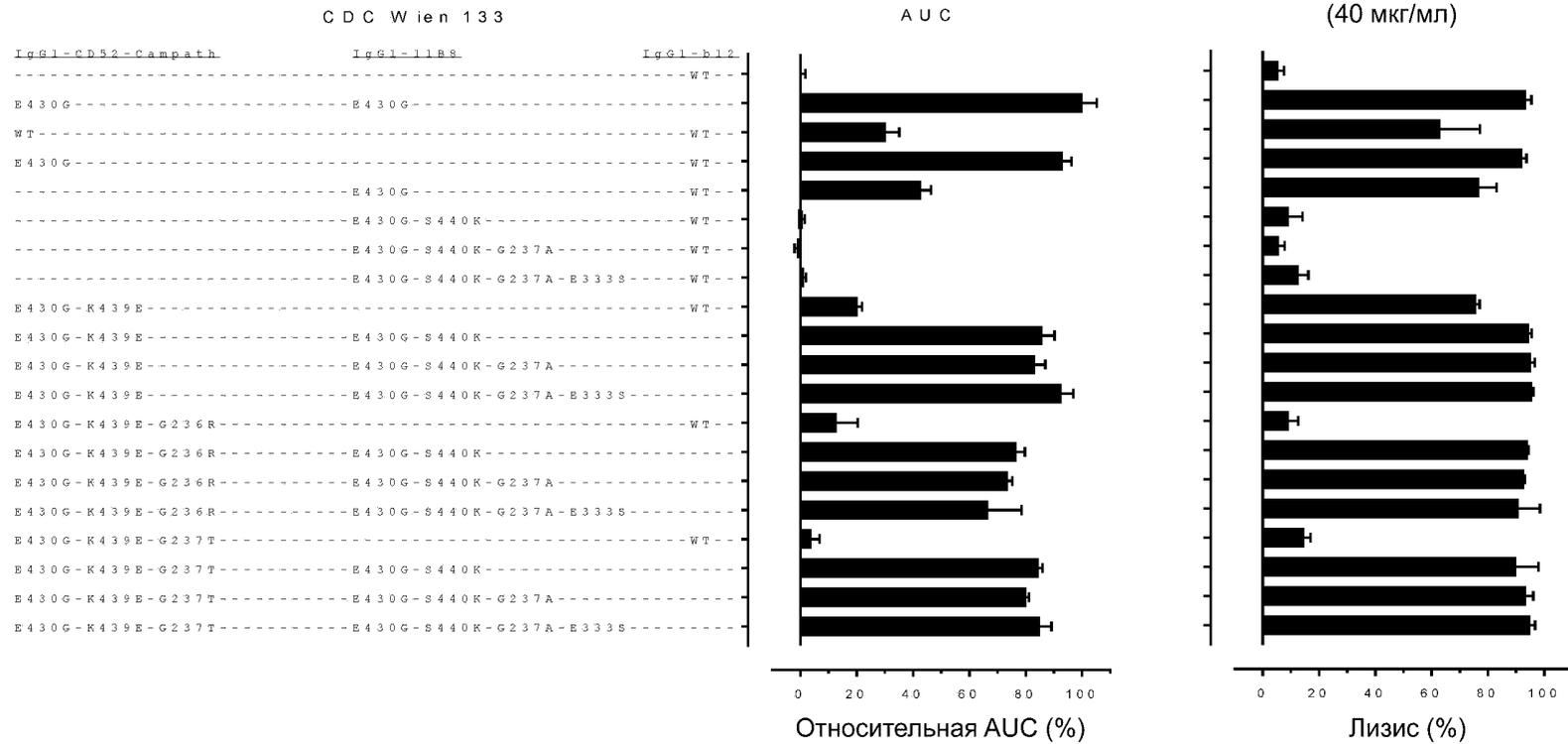
Фиг. 16 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



Фиг. 17



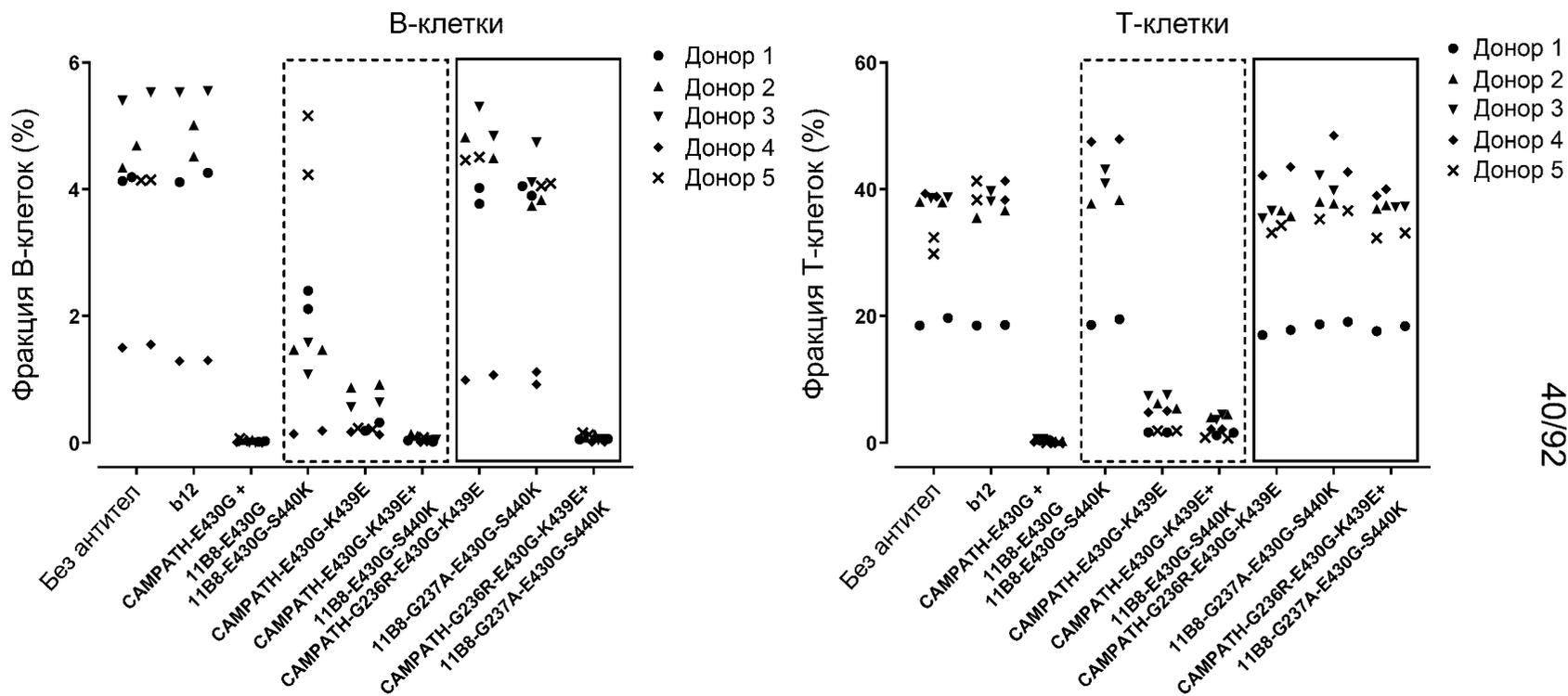
Фиг. 17 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



39/92

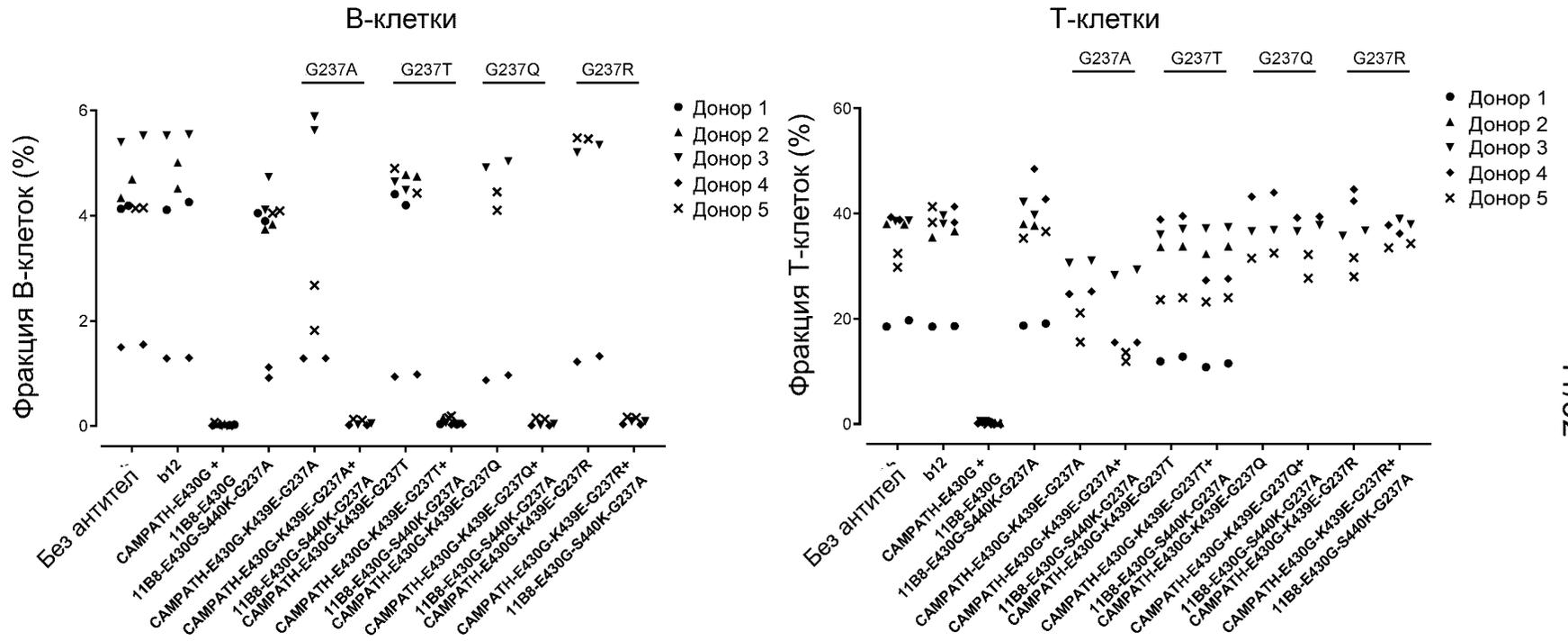
Фиг. 18

A



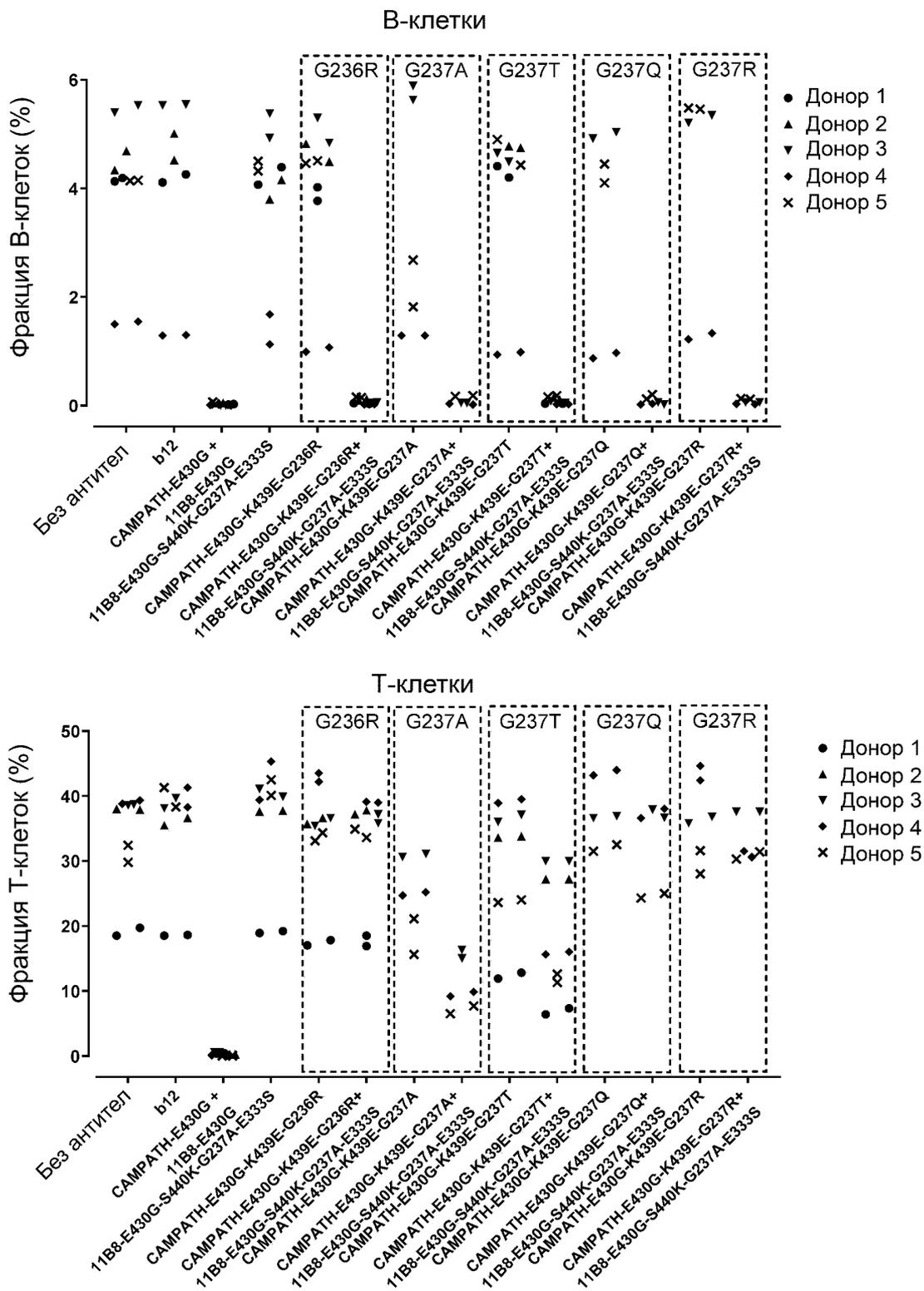
Фиг. 19

В



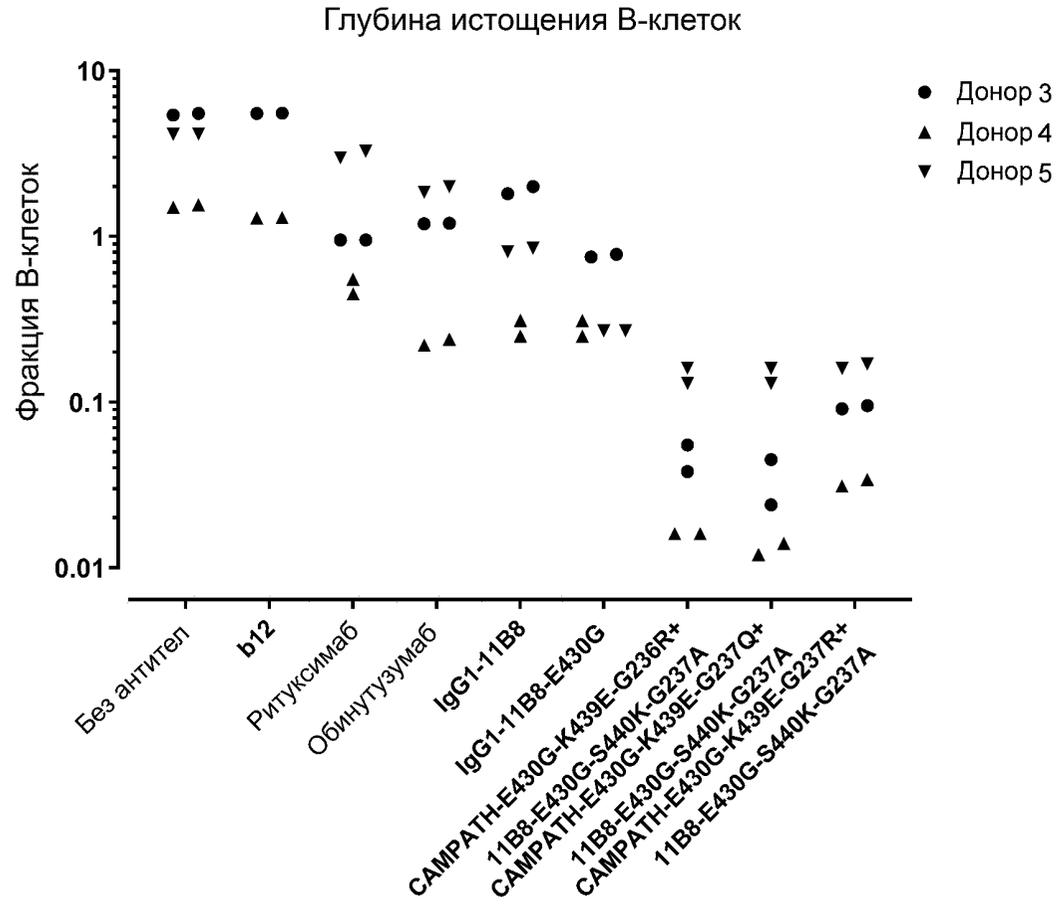
ФИГ. 19 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

C



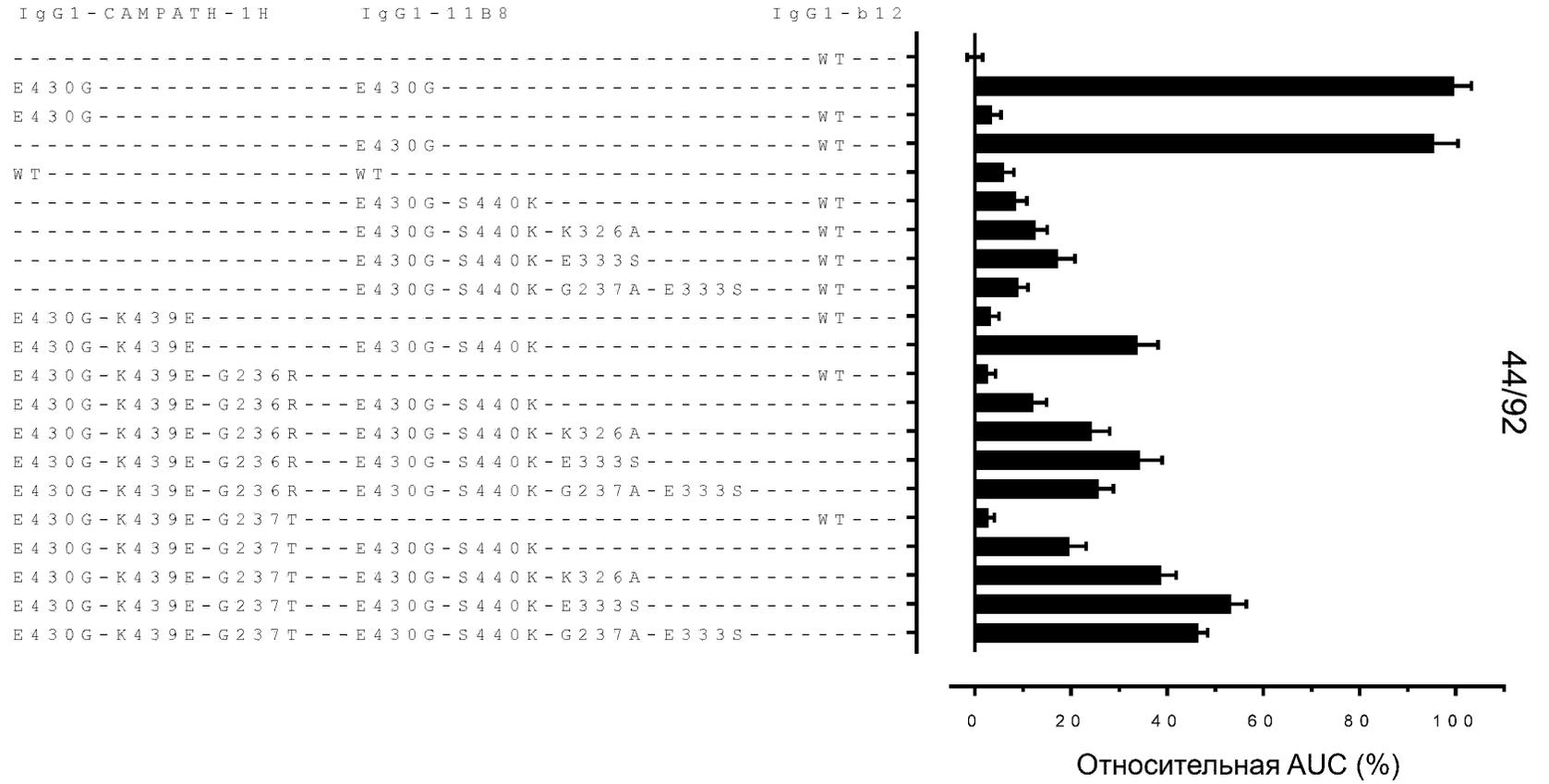
ФИГ. 19 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

D



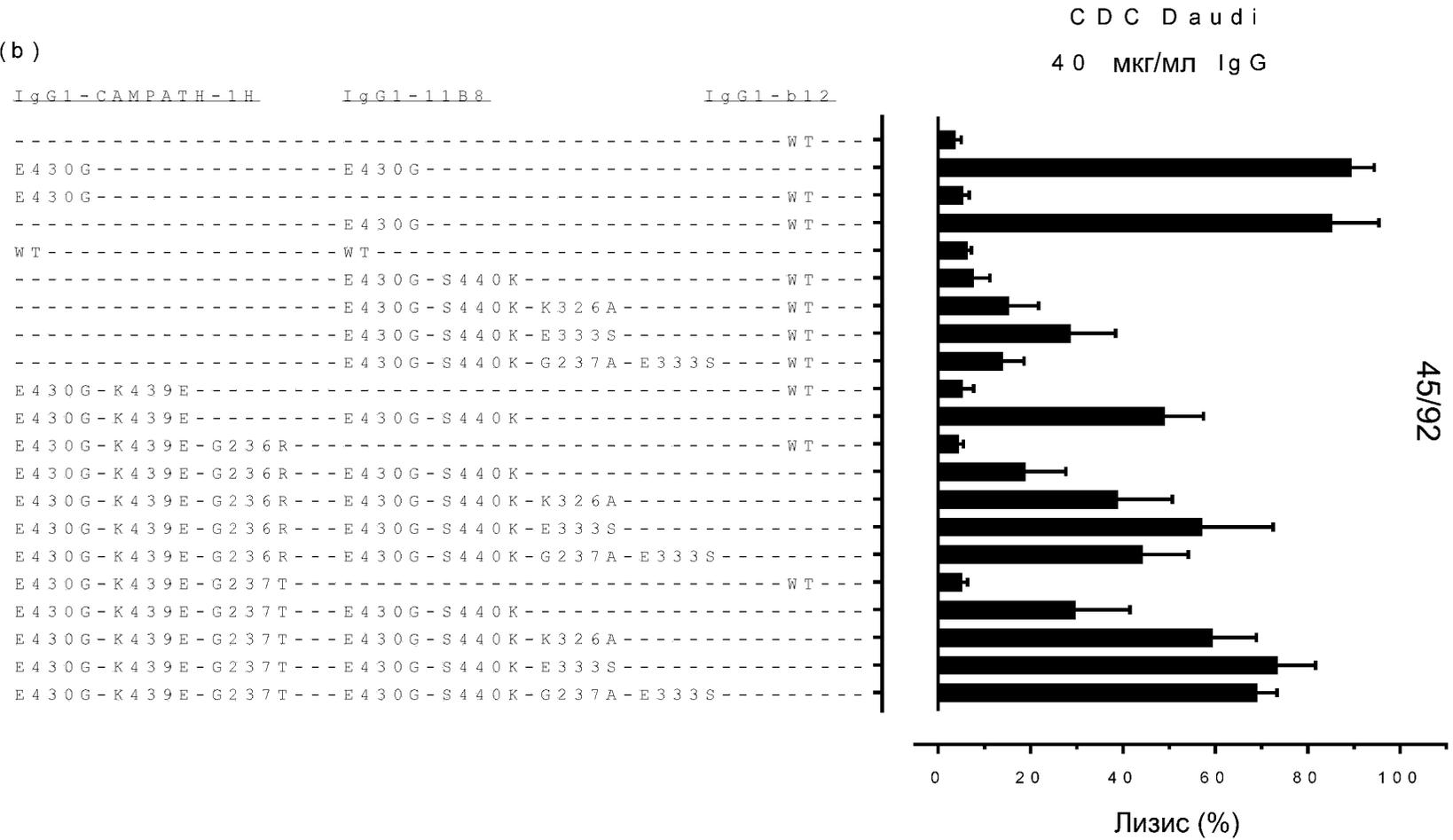
Фиг. 19 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

A (a)



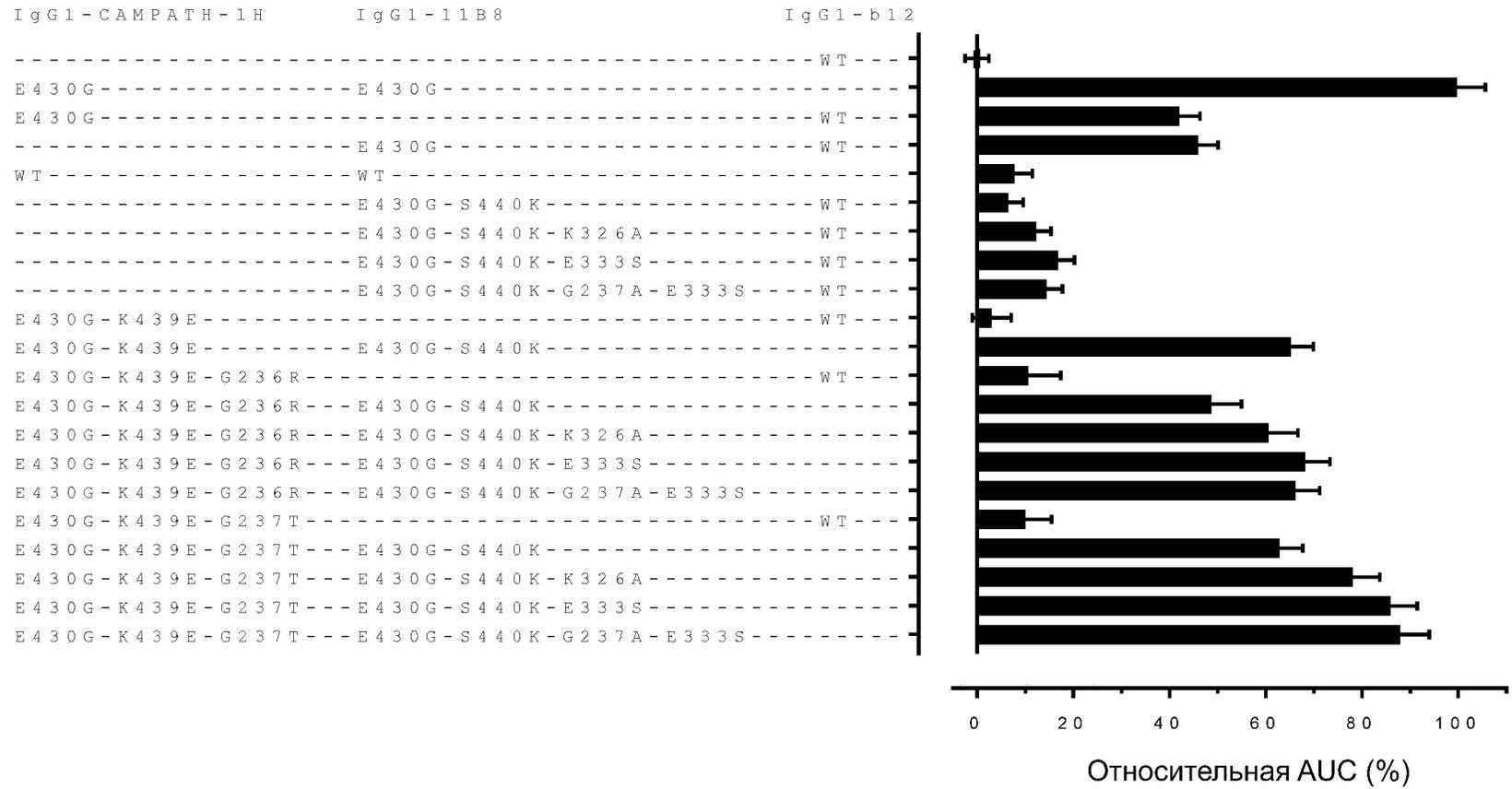
Фиг. 20

A (b)



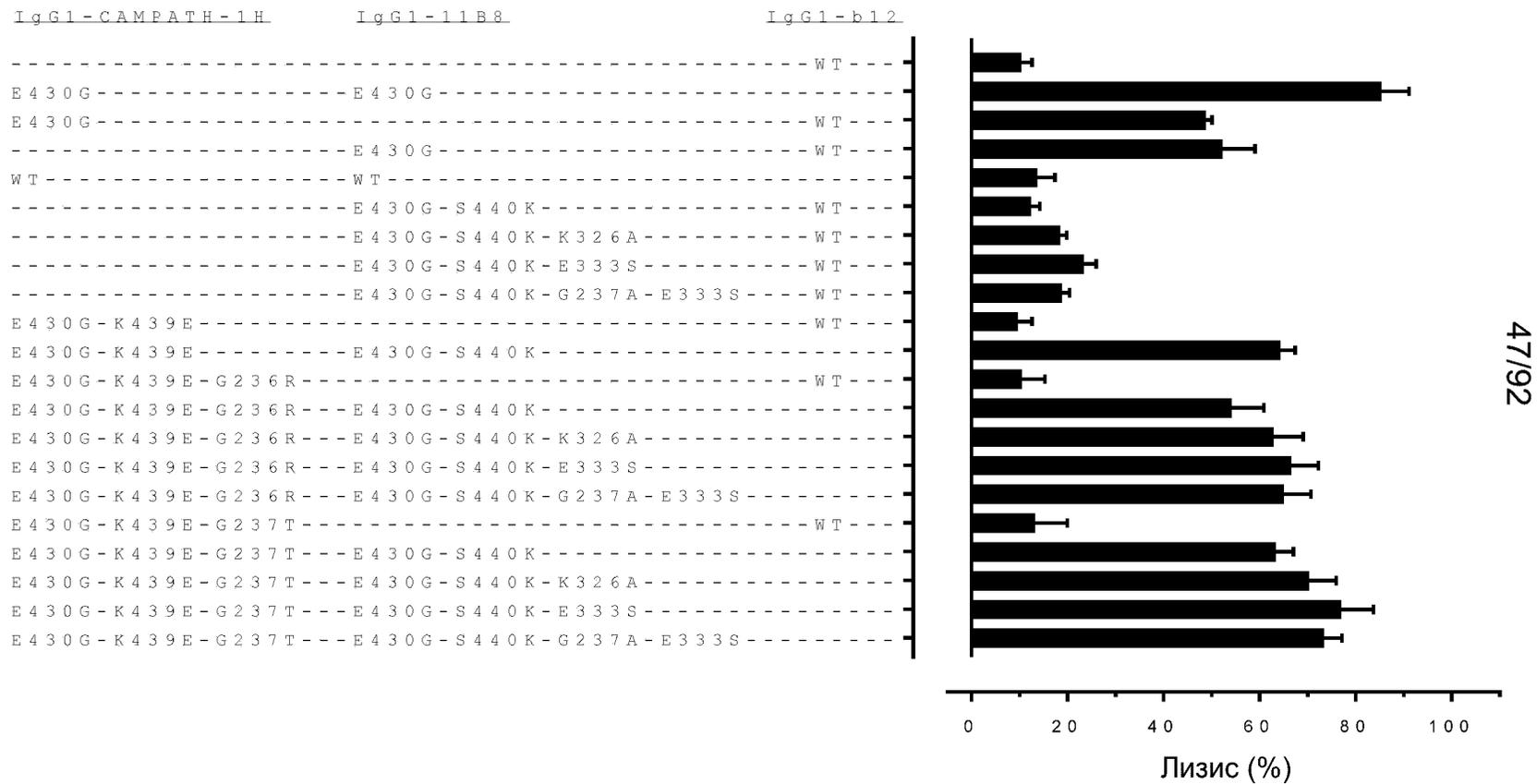
Фиг. 20 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

B (a)



Фиг. 20 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

B (b)

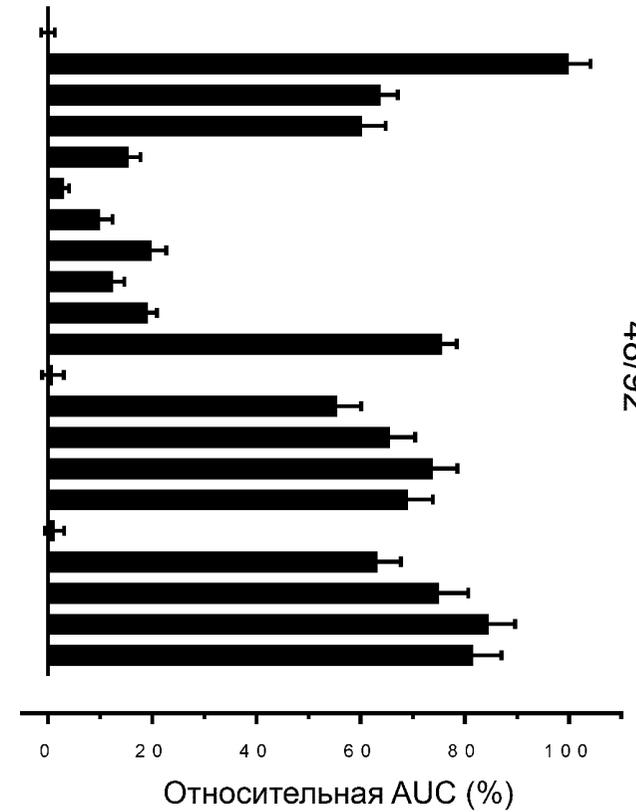


Фиг. 20 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

C (a)

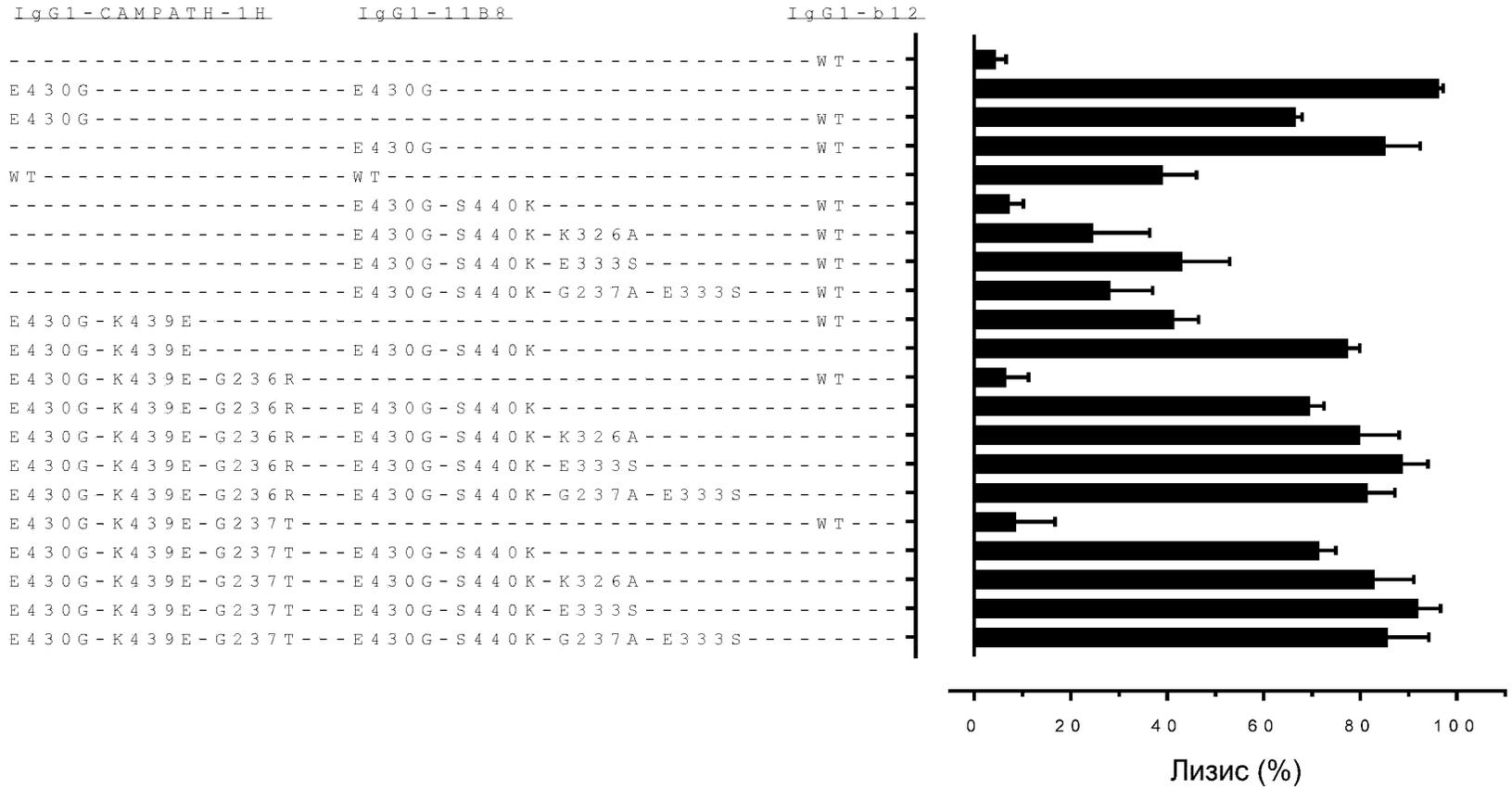
IgG1-CAMPATH-1H	IgG1-11B8	IgG1-b12
-----	-----	WT-----
E430G-----	E430G-----	-----
E430G-----	-----	WT-----
-----	E430G-----	WT-----
WT-----	WT-----	-----
-----	E430G-S440K-----	WT-----
-----	E430G-S440K-K326A-----	WT-----
-----	E430G-S440K-E333S-----	WT-----
-----	E430G-S440K-G237A-E333S-----	WT-----
E430G-K439E-----	-----	WT-----
E430G-K439E-----	E430G-S440K-----	-----
E430G-K439E-G236R-----	-----	WT-----
E430G-K439E-G236R-----	E430G-S440K-----	-----
E430G-K439E-G236R-----	E430G-S440K-K326A-----	-----
E430G-K439E-G236R-----	E430G-S440K-E333S-----	-----
E430G-K439E-G236R-----	E430G-S440K-G237A-E333S-----	-----
E430G-K439E-G237T-----	-----	WT-----
E430G-K439E-G237T-----	E430G-S440K-----	-----
E430G-K439E-G237T-----	E430G-S440K-K326A-----	-----
E430G-K439E-G237T-----	E430G-S440K-E333S-----	-----
E430G-K439E-G237T-----	E430G-S440K-G237A-E333S-----	-----

Ramos CDC - AUC



Фиг. 20 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

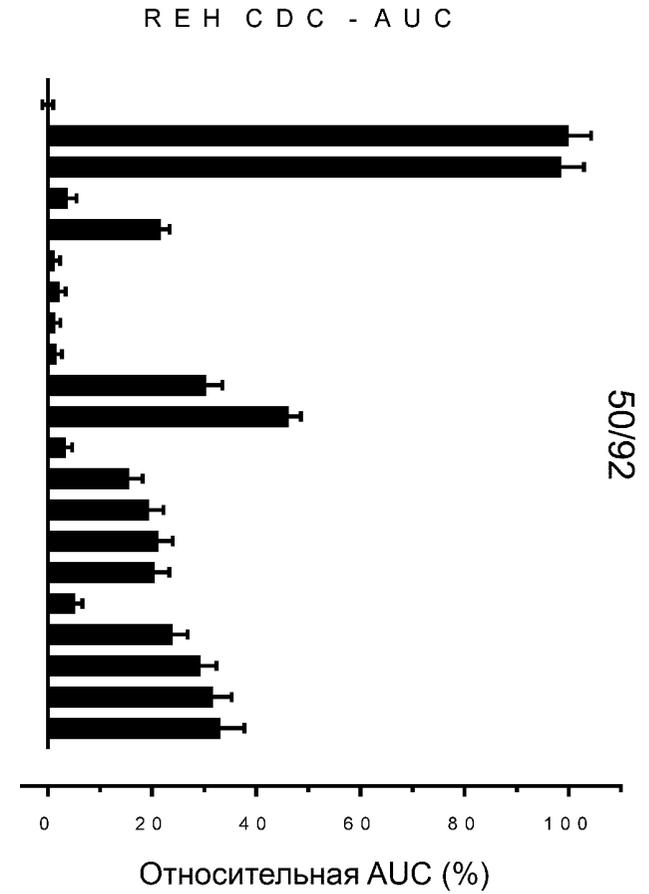
C (b)



Фиг. 20 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

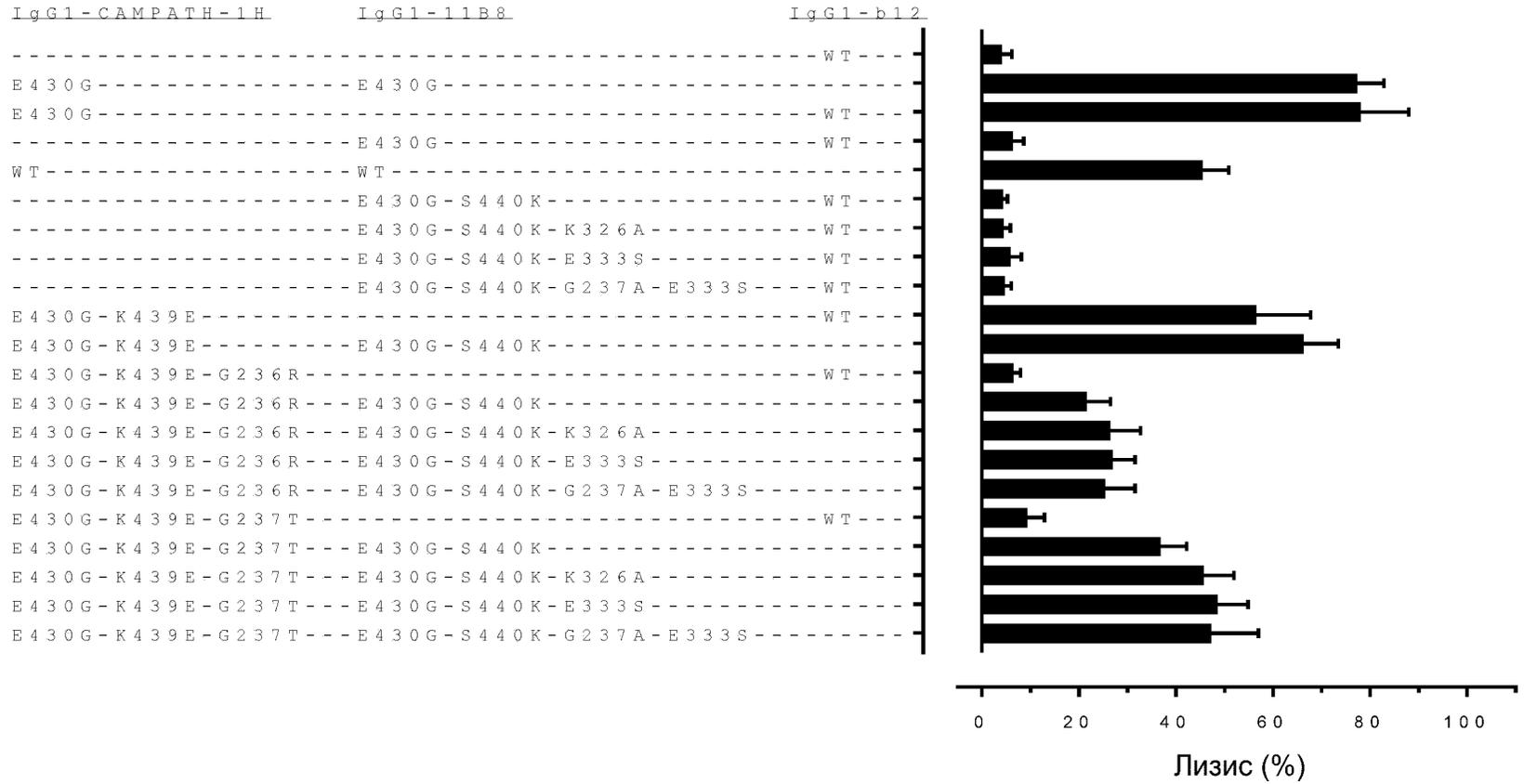
D (a)

<u>I g G 1 - C A M P A T H - 1 H</u>	<u>I g G 1 - 1 1 B 8</u>	<u>I g G 1 - b 1 2</u>
-----	-----	----- W T -----
E 4 3 0 G -----	E 4 3 0 G -----	-----
E 4 3 0 G -----	-----	----- W T -----
-----	E 4 3 0 G -----	----- W T -----
W T -----	----- W T -----	-----
-----	E 4 3 0 G - S 4 4 0 K -----	----- W T -----
-----	E 4 3 0 G - S 4 4 0 K - K 3 2 6 A -----	----- W T -----
-----	E 4 3 0 G - S 4 4 0 K - E 3 3 3 S -----	----- W T -----
-----	E 4 3 0 G - S 4 4 0 K - G 2 3 7 A - E 3 3 3 S -----	----- W T -----
E 4 3 0 G - K 4 3 9 E -----	-----	----- W T -----
E 4 3 0 G - K 4 3 9 E -----	E 4 3 0 G - S 4 4 0 K -----	-----
E 4 3 0 G - K 4 3 9 E - G 2 3 6 R -----	-----	----- W T -----
E 4 3 0 G - K 4 3 9 E - G 2 3 6 R -----	E 4 3 0 G - S 4 4 0 K -----	-----
E 4 3 0 G - K 4 3 9 E - G 2 3 6 R -----	E 4 3 0 G - S 4 4 0 K - K 3 2 6 A -----	-----
E 4 3 0 G - K 4 3 9 E - G 2 3 6 R -----	E 4 3 0 G - S 4 4 0 K - E 3 3 3 S -----	-----
E 4 3 0 G - K 4 3 9 E - G 2 3 6 R -----	E 4 3 0 G - S 4 4 0 K - G 2 3 7 A - E 3 3 3 S -----	-----
E 4 3 0 G - K 4 3 9 E - G 2 3 7 T -----	-----	----- W T -----
E 4 3 0 G - K 4 3 9 E - G 2 3 7 T -----	E 4 3 0 G - S 4 4 0 K -----	-----
E 4 3 0 G - K 4 3 9 E - G 2 3 7 T -----	E 4 3 0 G - S 4 4 0 K - K 3 2 6 A -----	-----
E 4 3 0 G - K 4 3 9 E - G 2 3 7 T -----	E 4 3 0 G - S 4 4 0 K - E 3 3 3 S -----	-----
E 4 3 0 G - K 4 3 9 E - G 2 3 7 T -----	E 4 3 0 G - S 4 4 0 K - G 2 3 7 A - E 3 3 3 S -----	-----



Фиг. 20 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

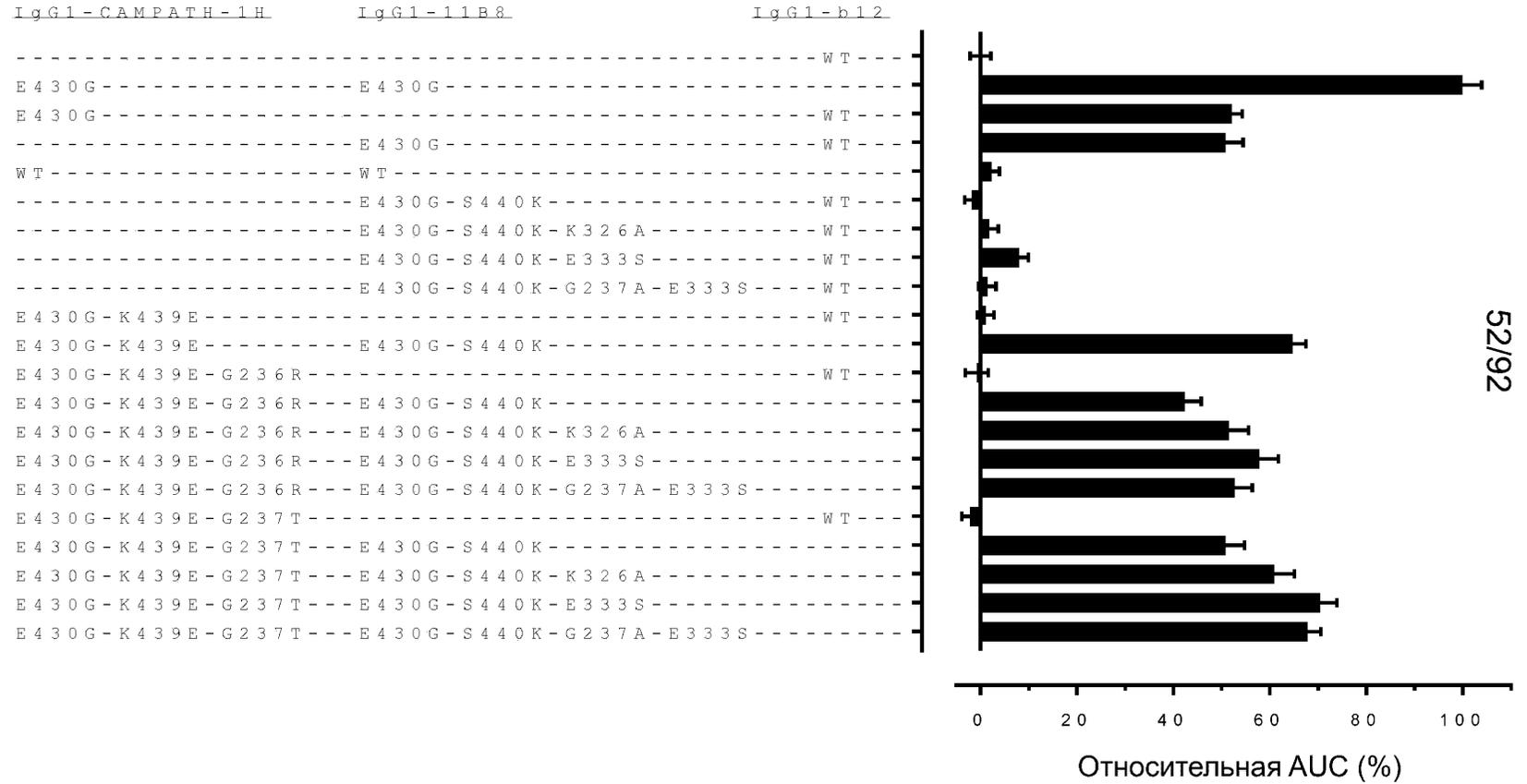
D (b)



51/92

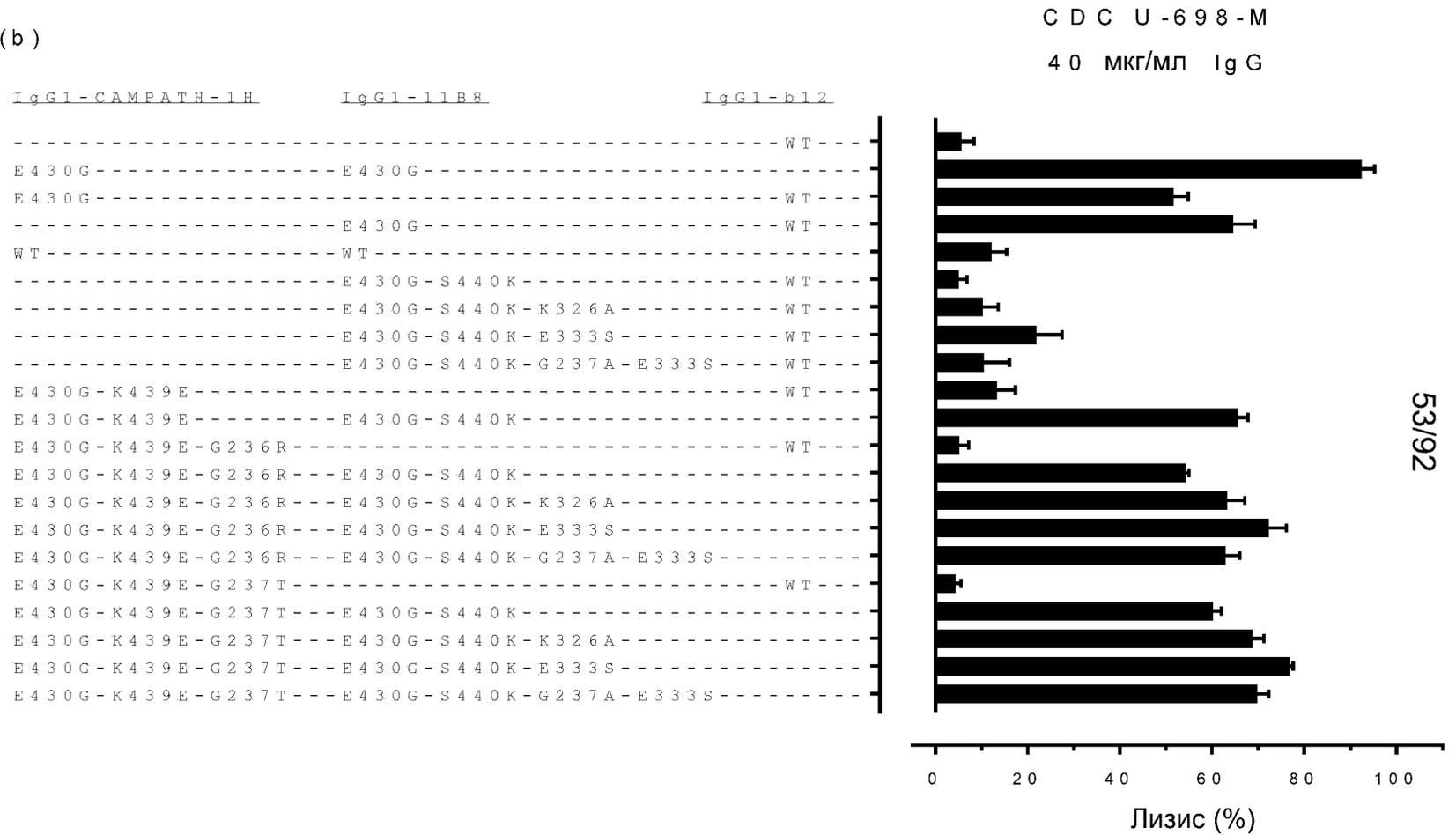
Фиг. 20 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

E (a)

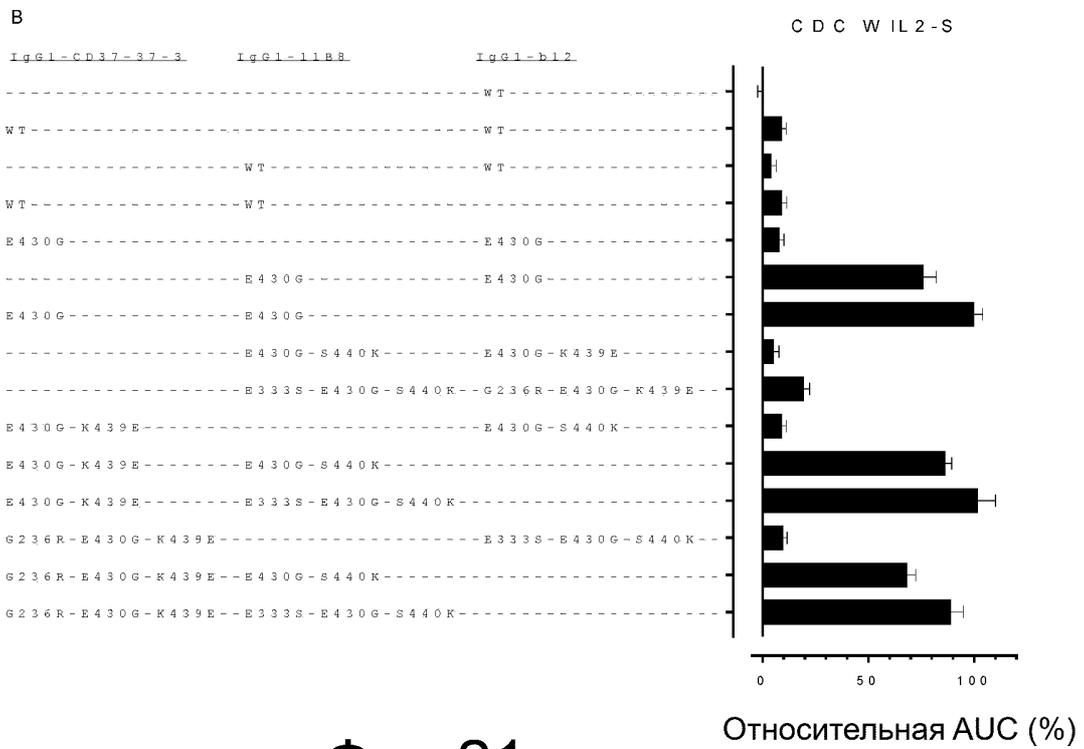
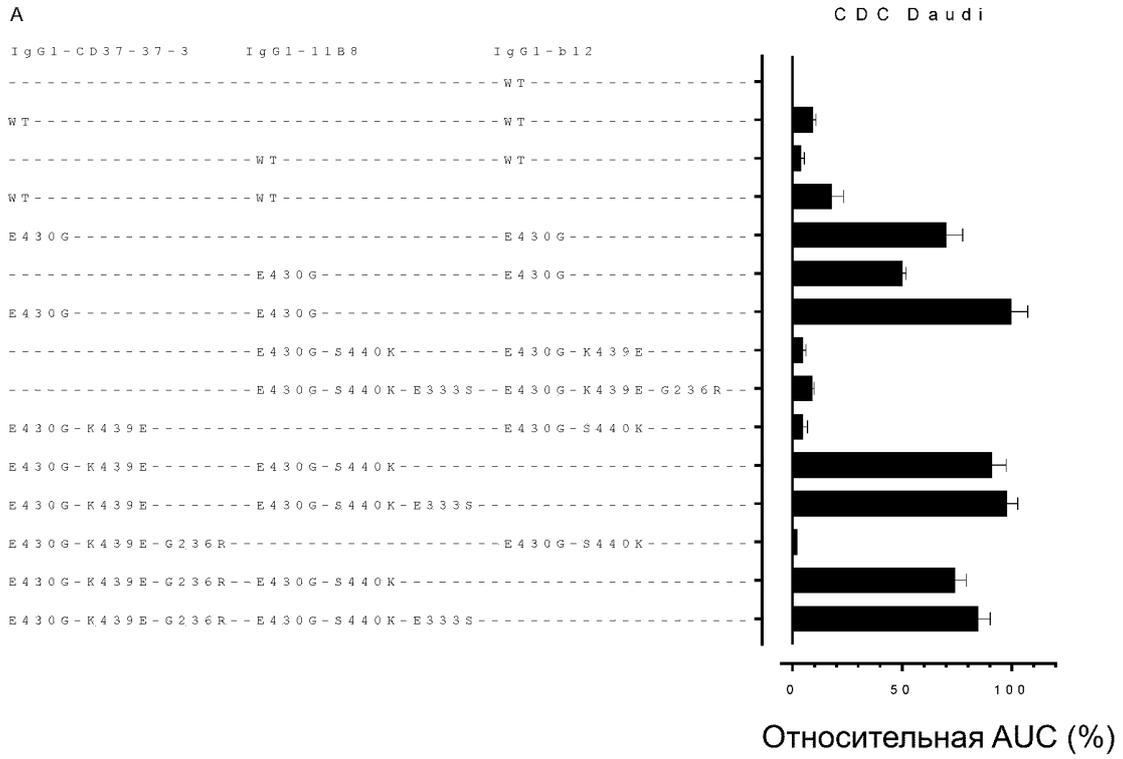


Фиг. 20 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

E (b)



Фиг. 20 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

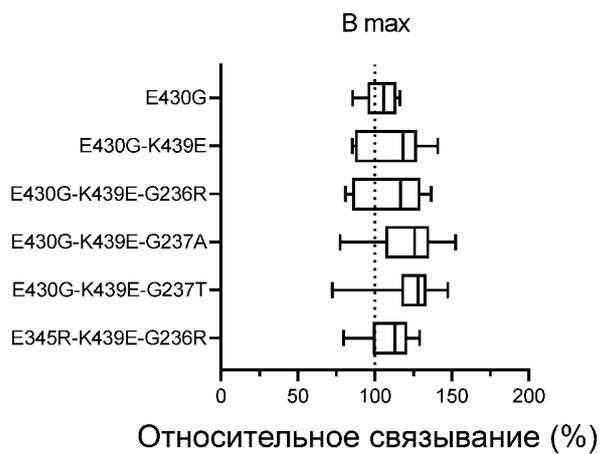


Фиг. 21

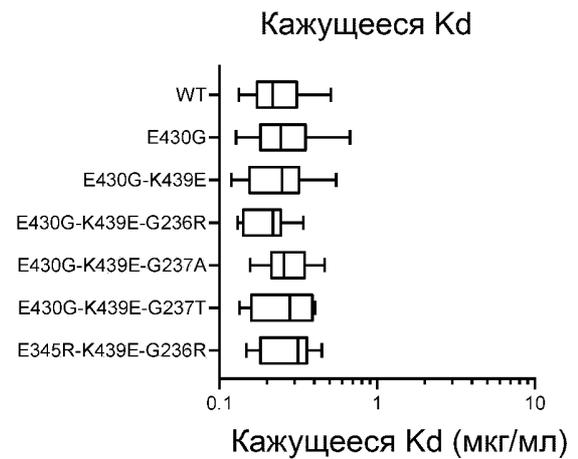
A



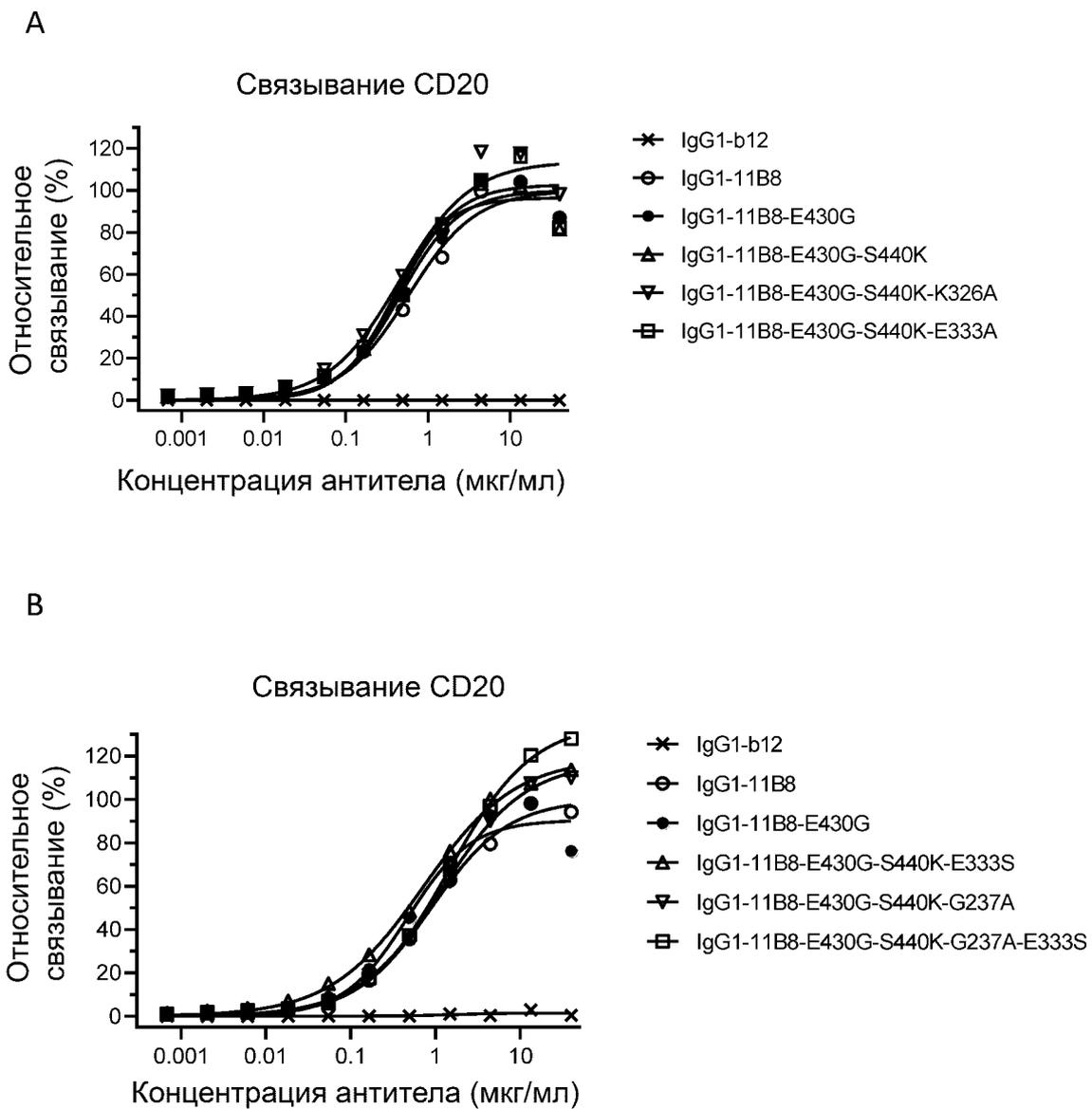
B



C

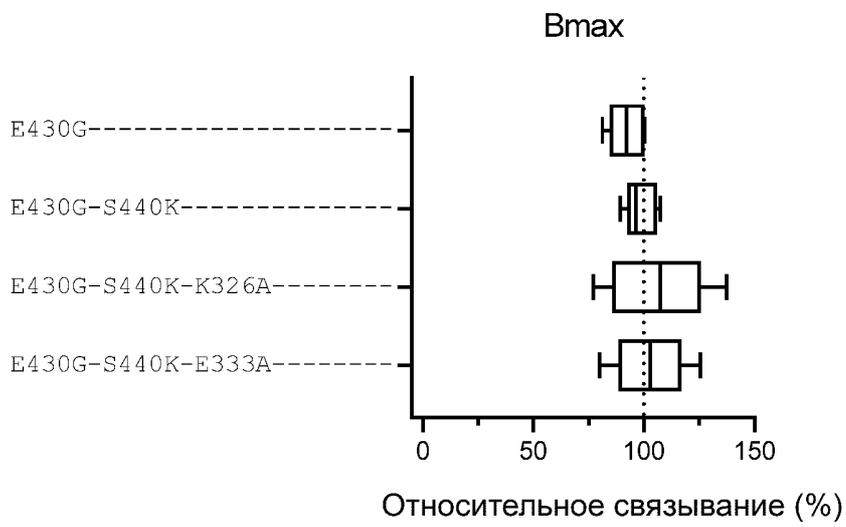


Фиг. 22

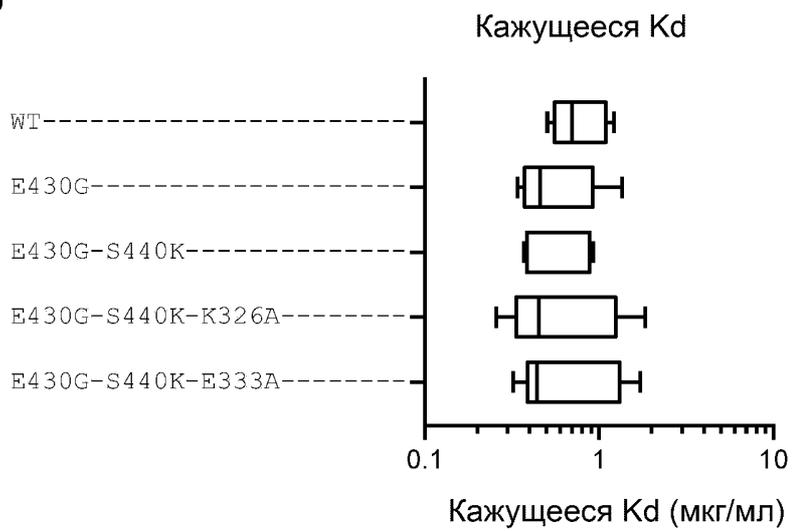


Фиг. 23

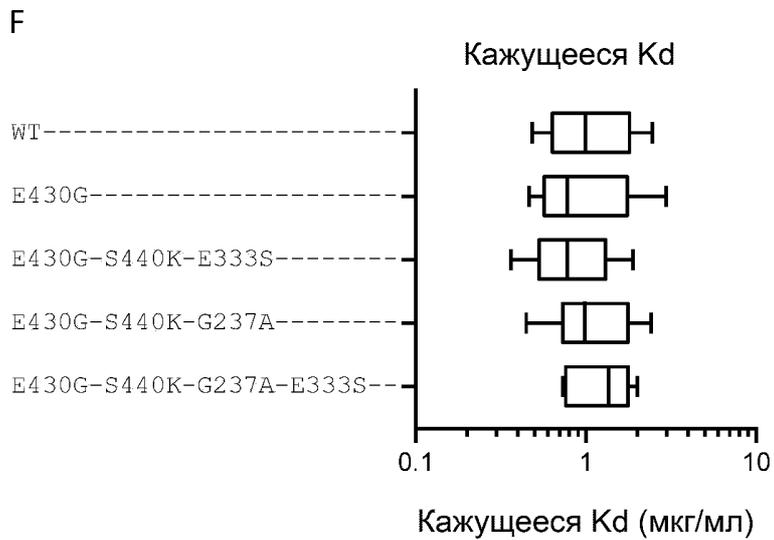
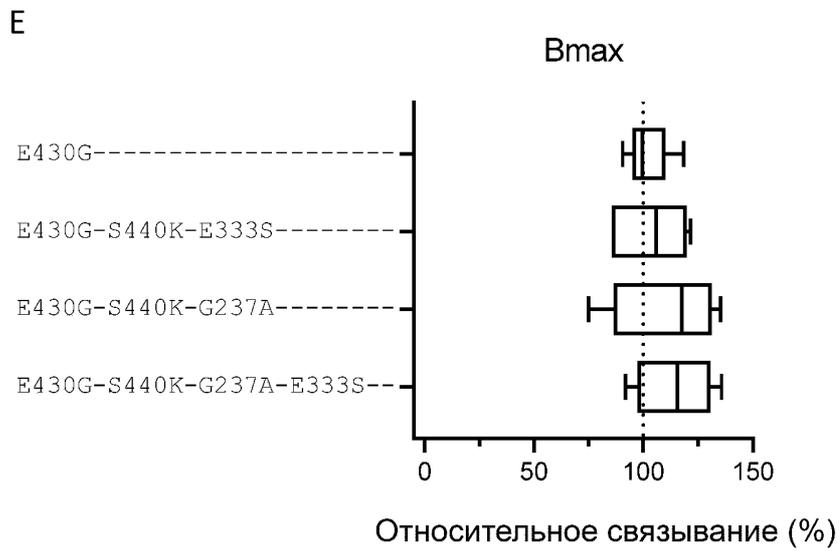
C



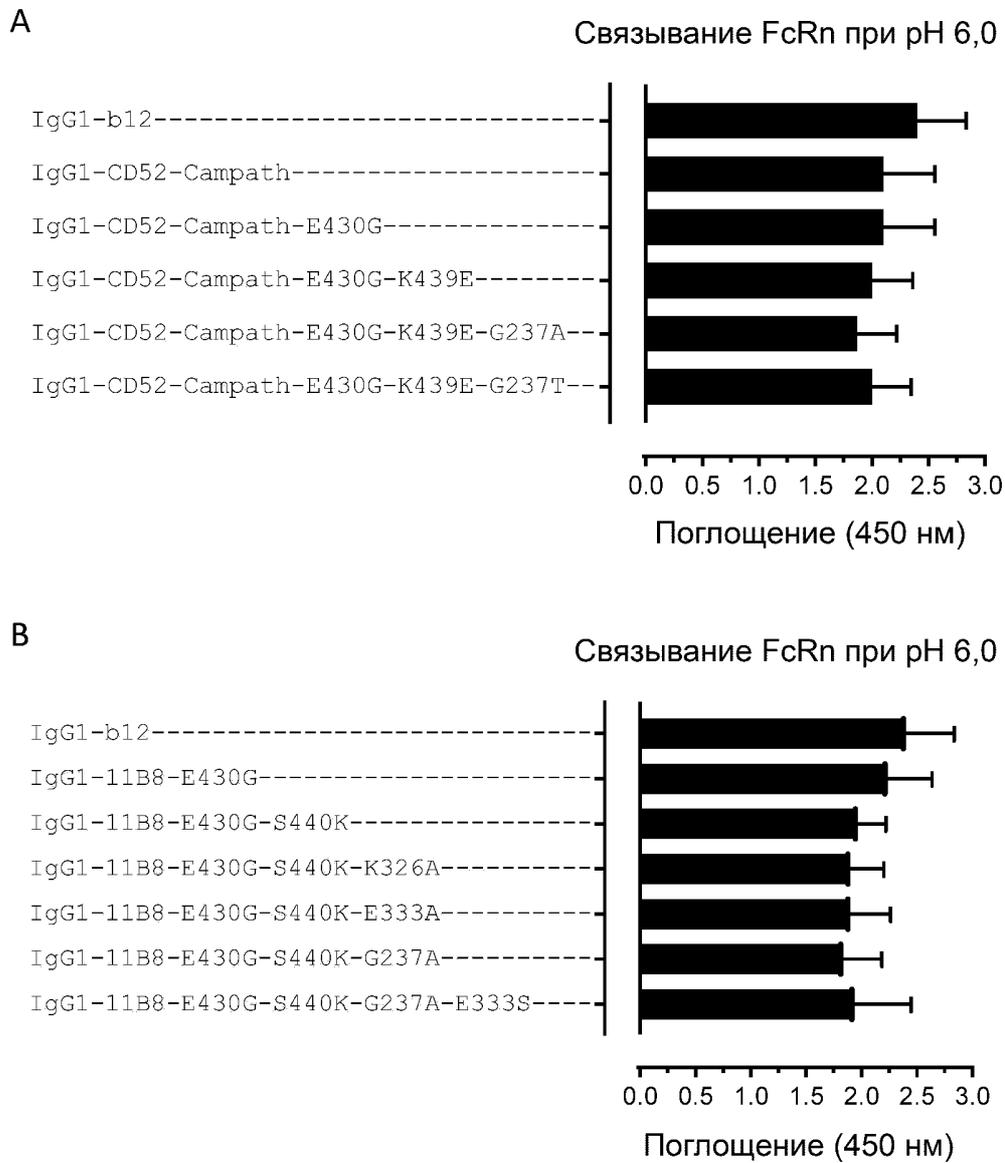
D



Фиг. 23 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



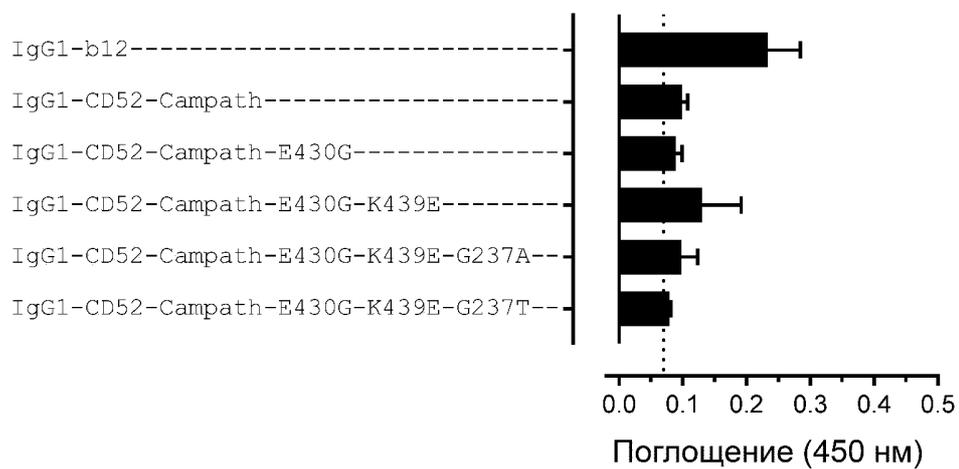
Фиг. 23 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



Фиг. 24

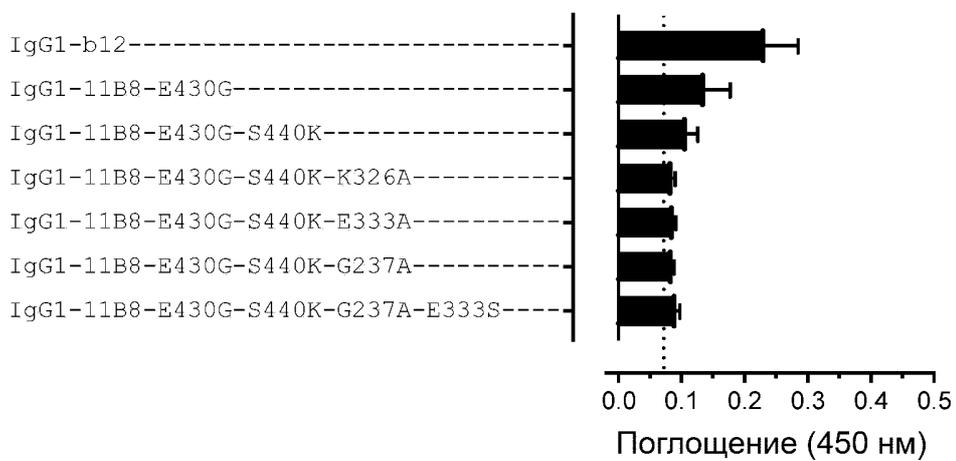
C

Связывание FcRn при pH 7,4

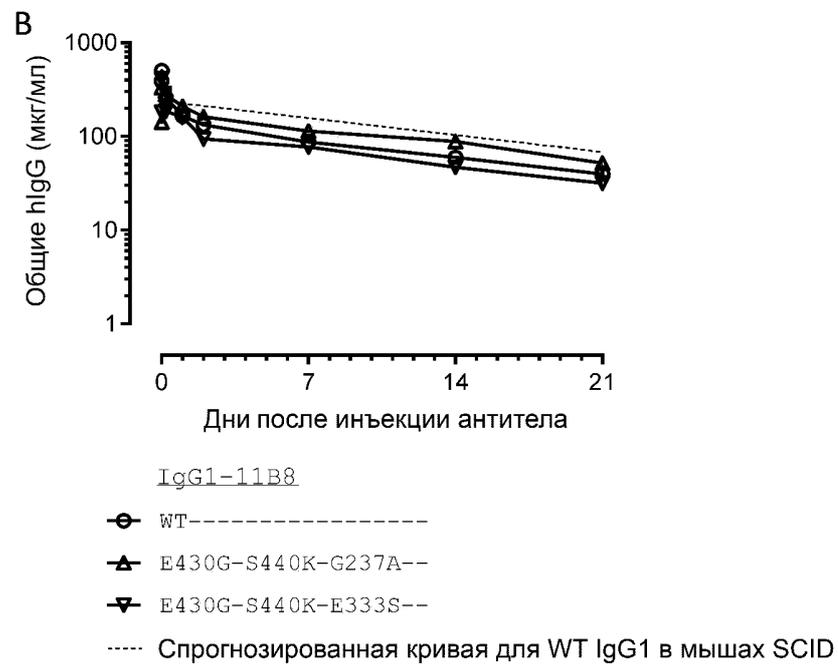
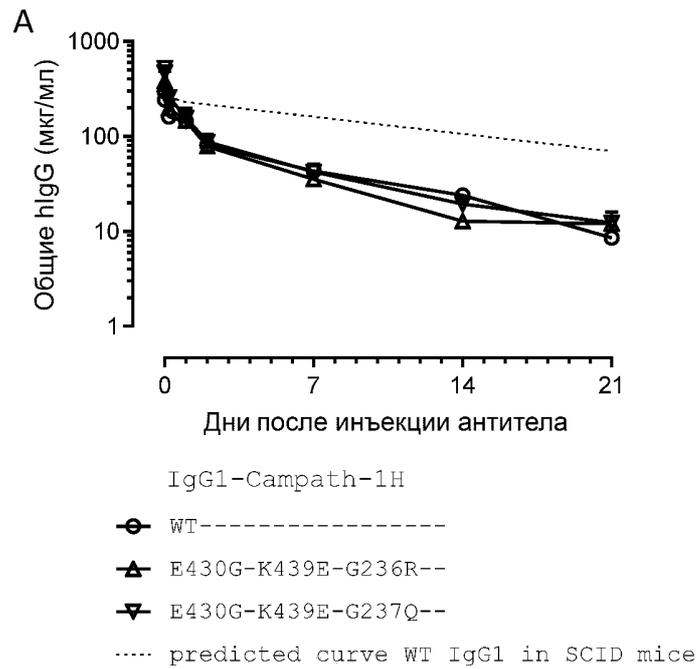


D

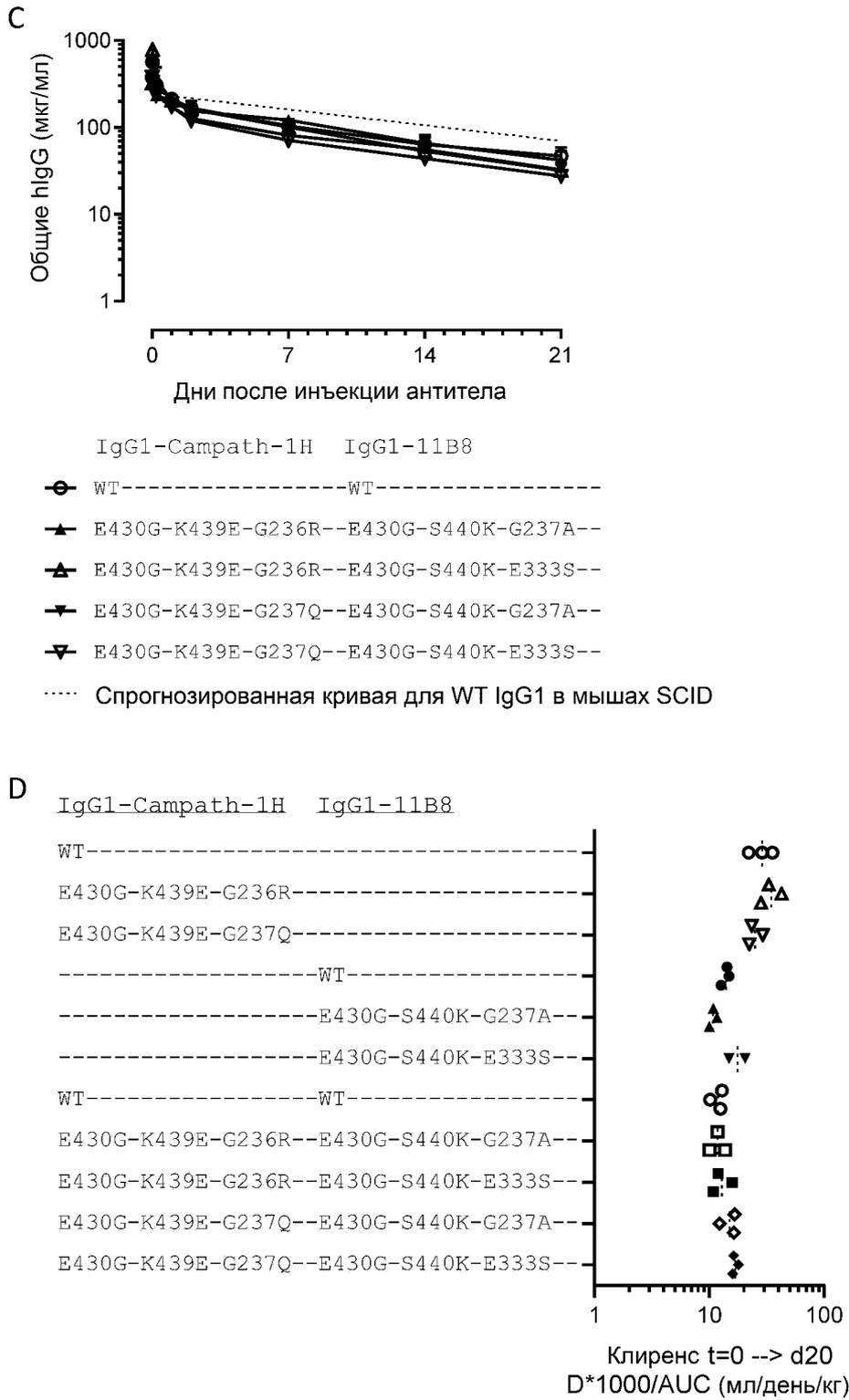
Связывание FcRn при pH 7,4



Фиг. 24 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

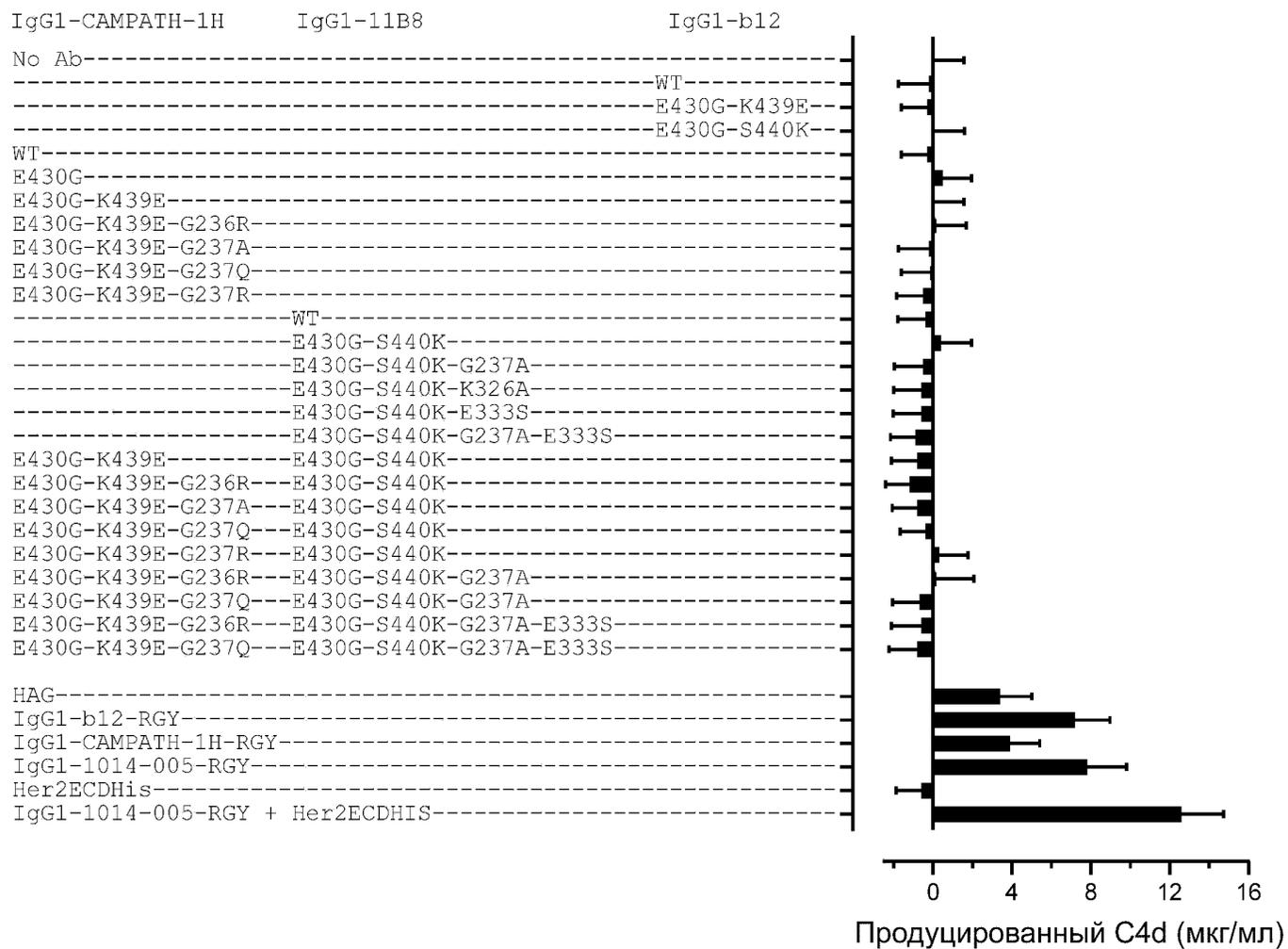


Фиг. 25



Фиг. 25 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

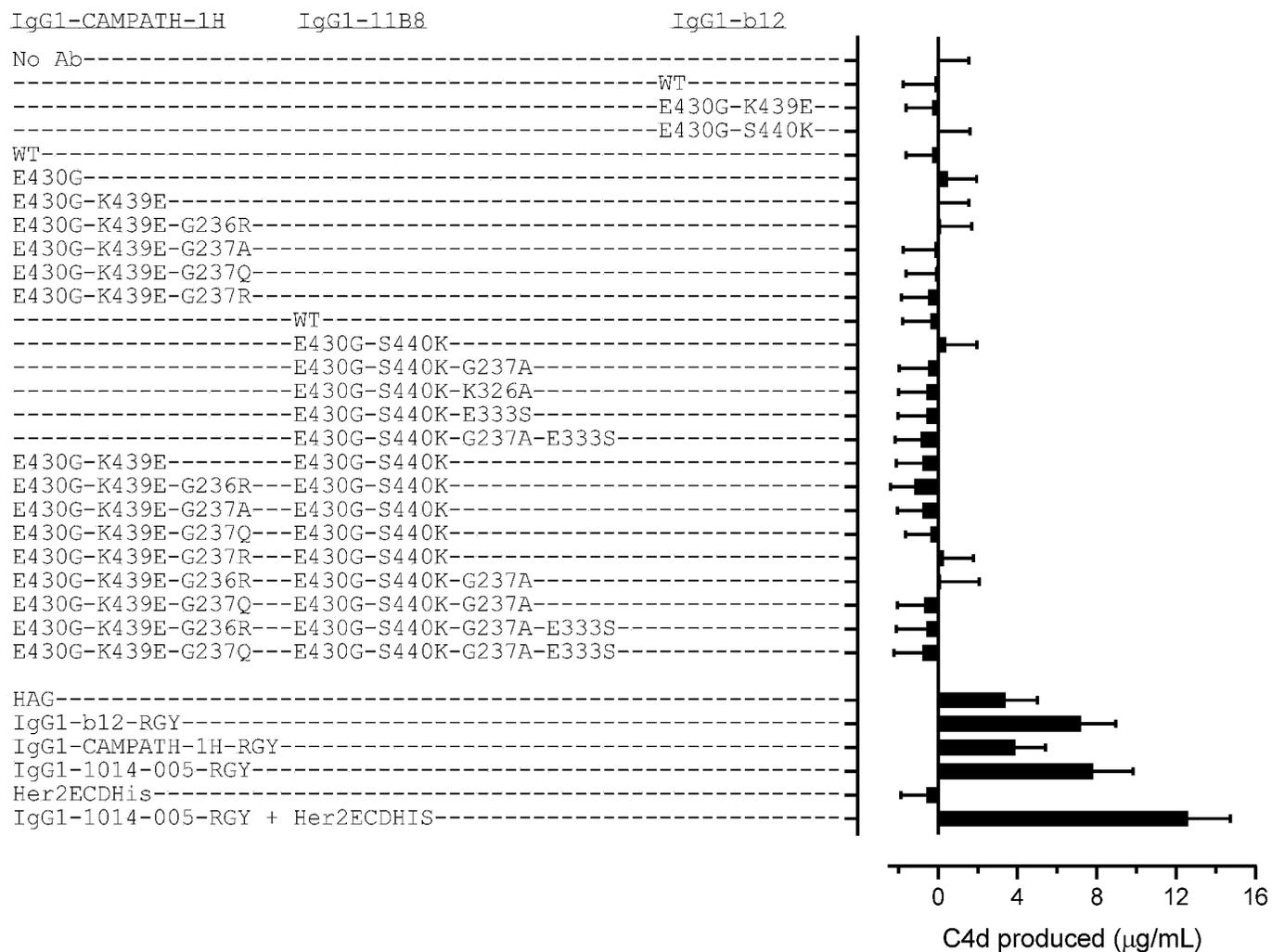
A



63/92

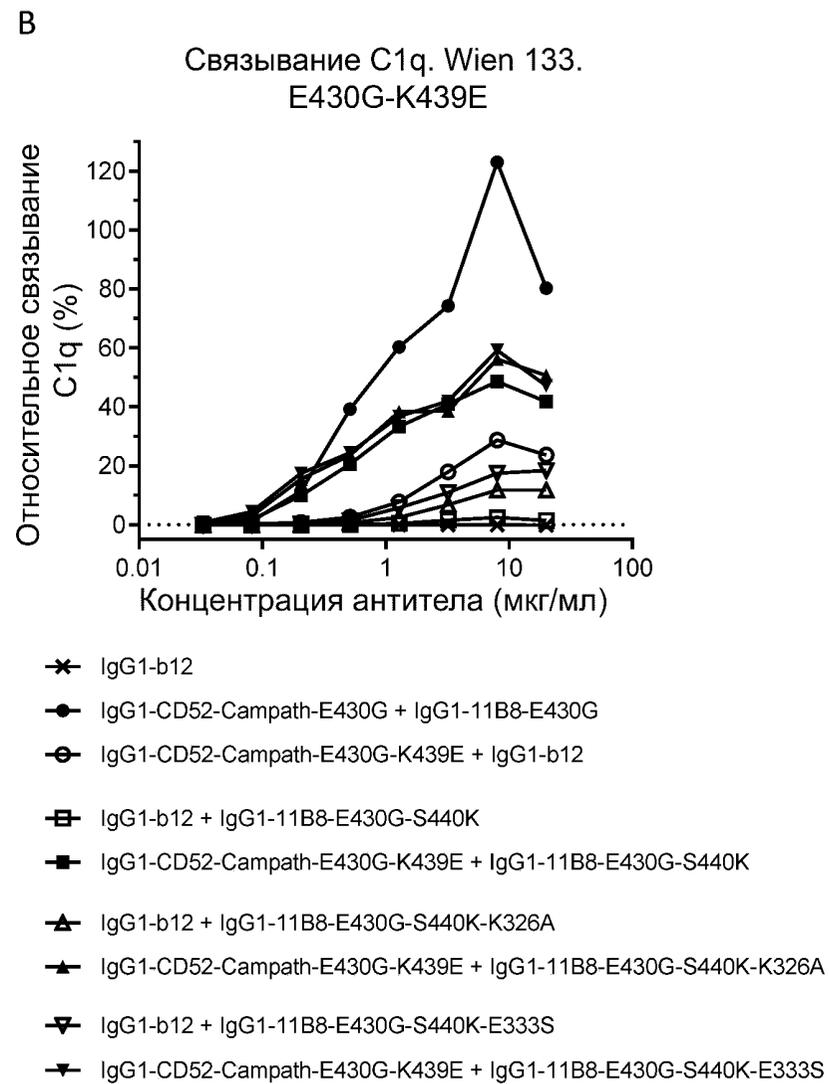
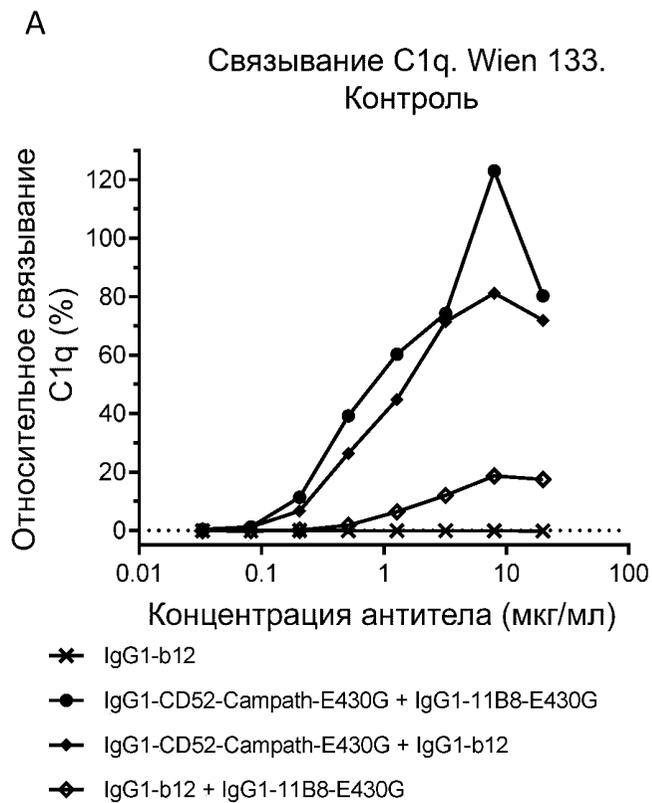
Фиг. 26

B

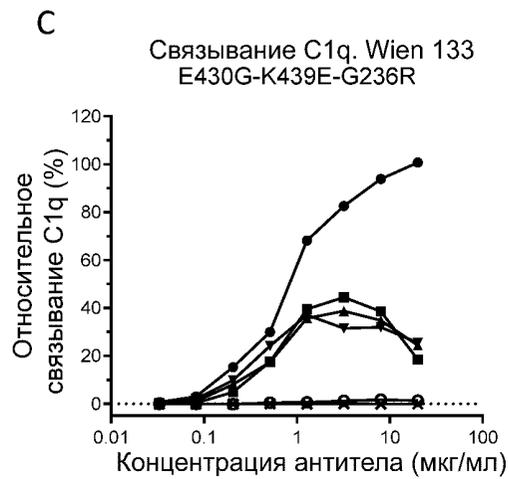


64/92

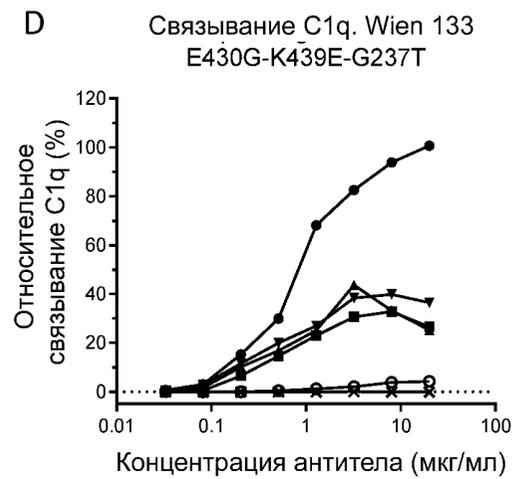
Фиг. 26 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



Фиг. 27



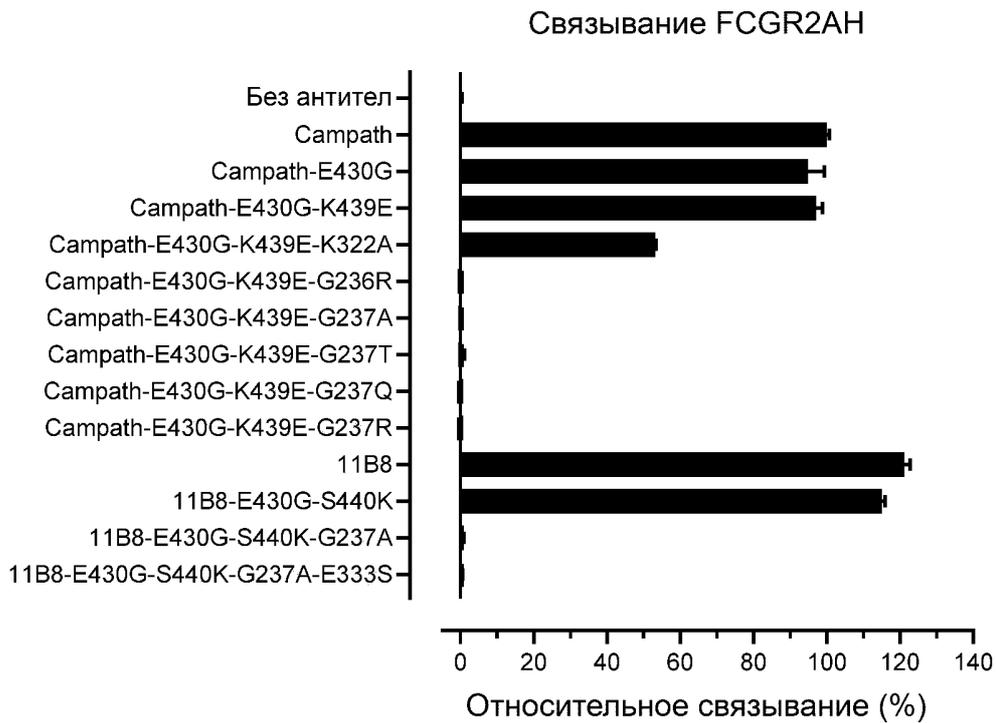
- ✱ IgG1-b12 + IgG1-b12
- IgG1-CD52-Campath-E430G + IgG1-11B8-E430G
- IgG1-CD52-Campath-E430G-K439E-G236R + IgG1-b12
- IgG1-CD52-Campath-E430G-K439E-G236R + IgG1-11B8-E430G-S440K
- ▲ IgG1-CD52-Campath-E430G-K439E-G236R + IgG1-11B8-E430G-S440K-K326A
- ▼ IgG1-CD52-Campath-E430G-K439E-G236R + IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S



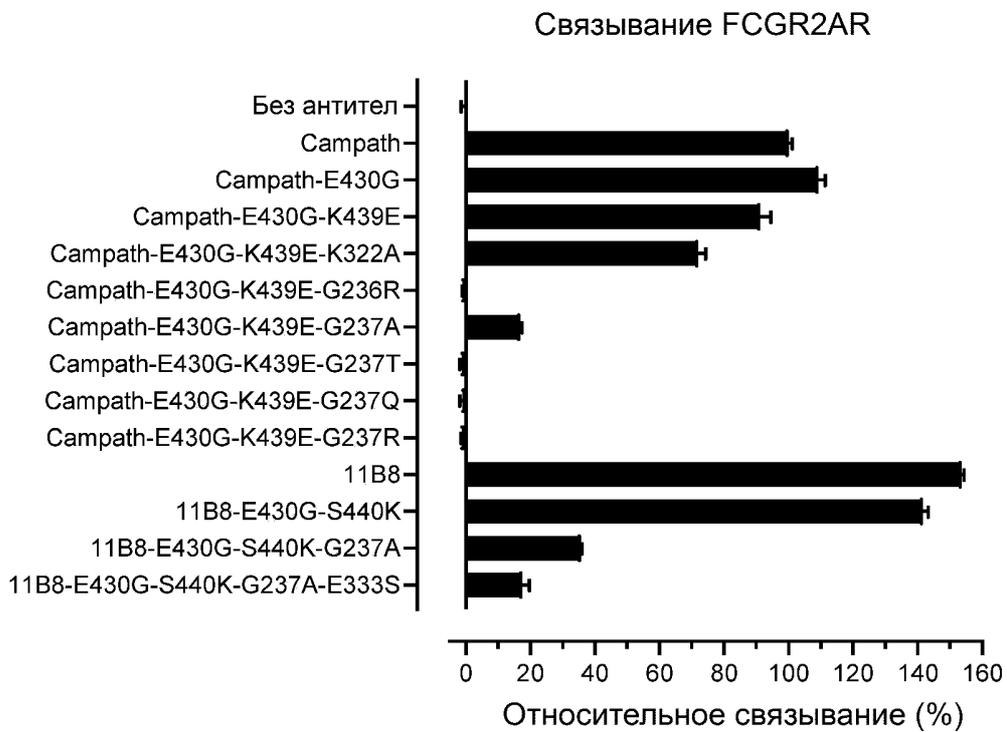
- ✱ IgG1-b12 + IgG1-b12
- IgG1-CD52-Campath-E430G + IgG1-11B8-E430G
- IgG1-CD52-Campath-E430G-K439E-G237T + IgG1-b12
- IgG1-CD52-Campath-E430G-K439E-G237T + IgG1-11B8-E430G-S440K
- ▲ IgG1-CD52-Campath-E430G-K439E-G237T + IgG1-11B8-E430G-S440K-K326A
- ▼ IgG1-CD52-Campath-E430G-K439E-G237T + IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S

Фиг. 27 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

A

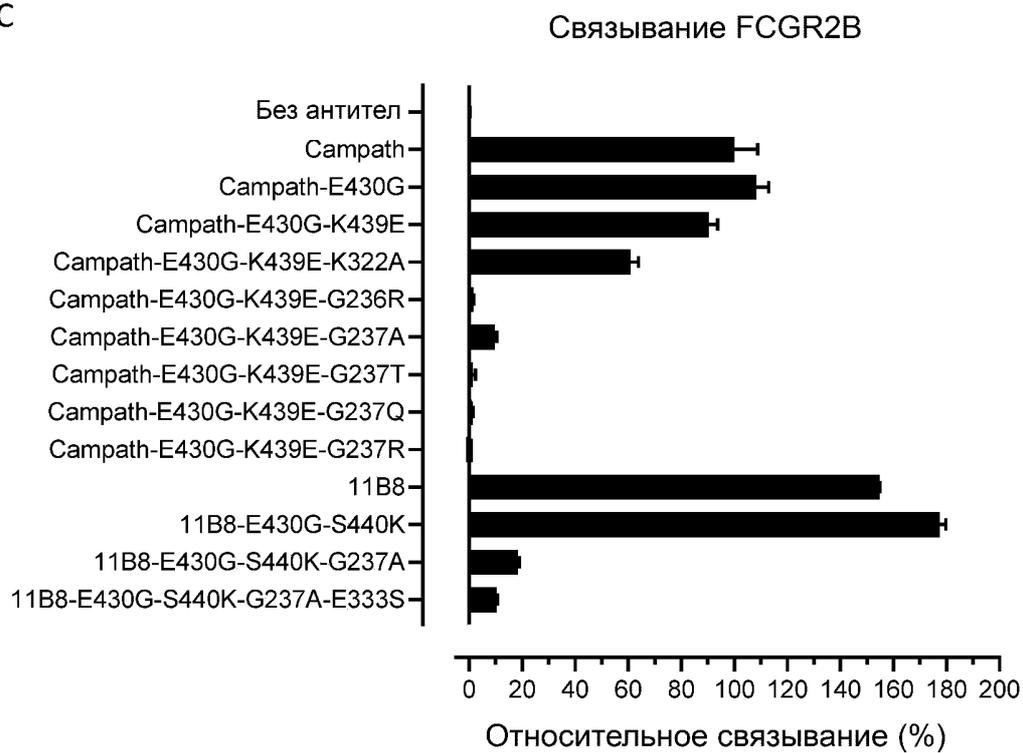


B

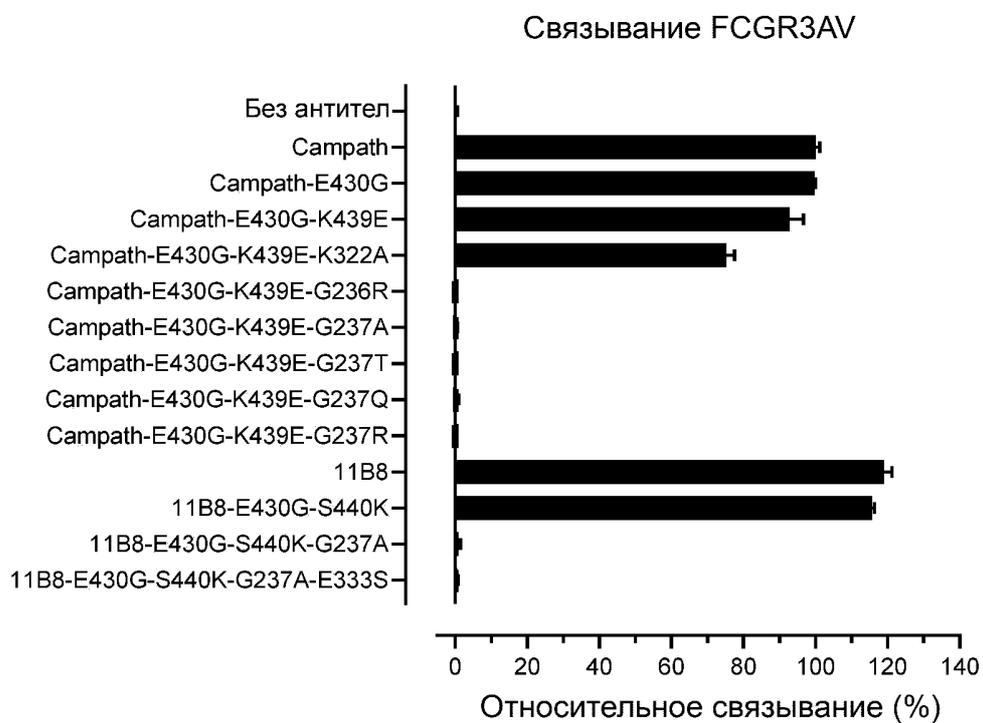


Фиг. 28

C

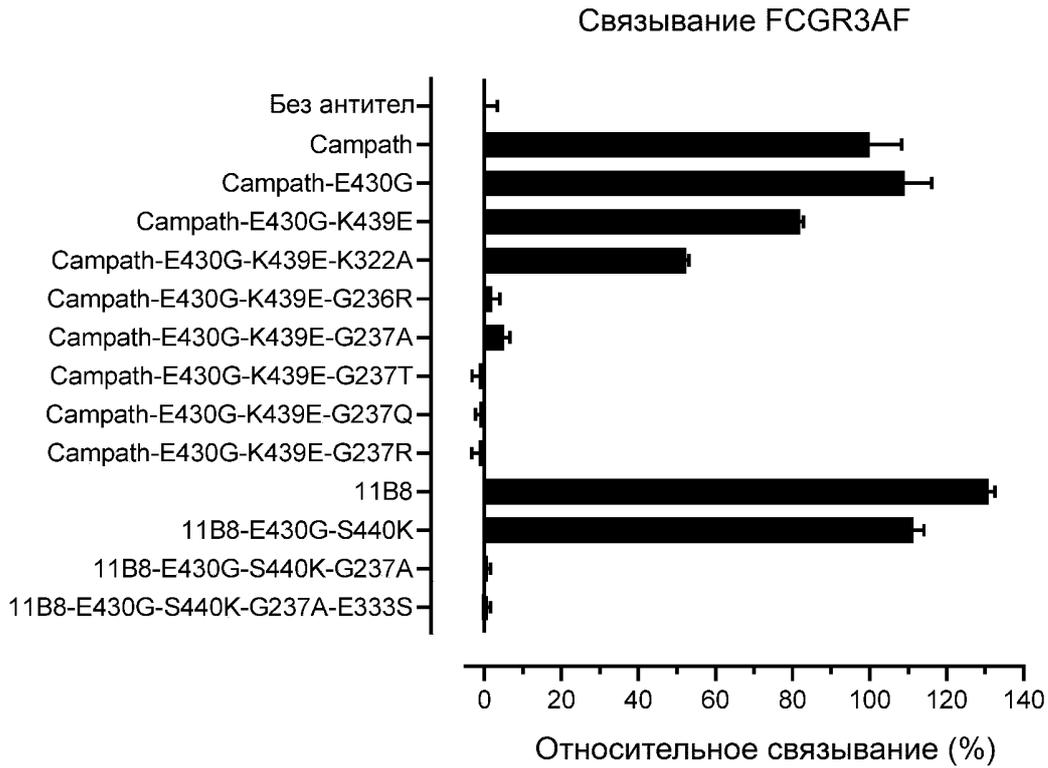


D

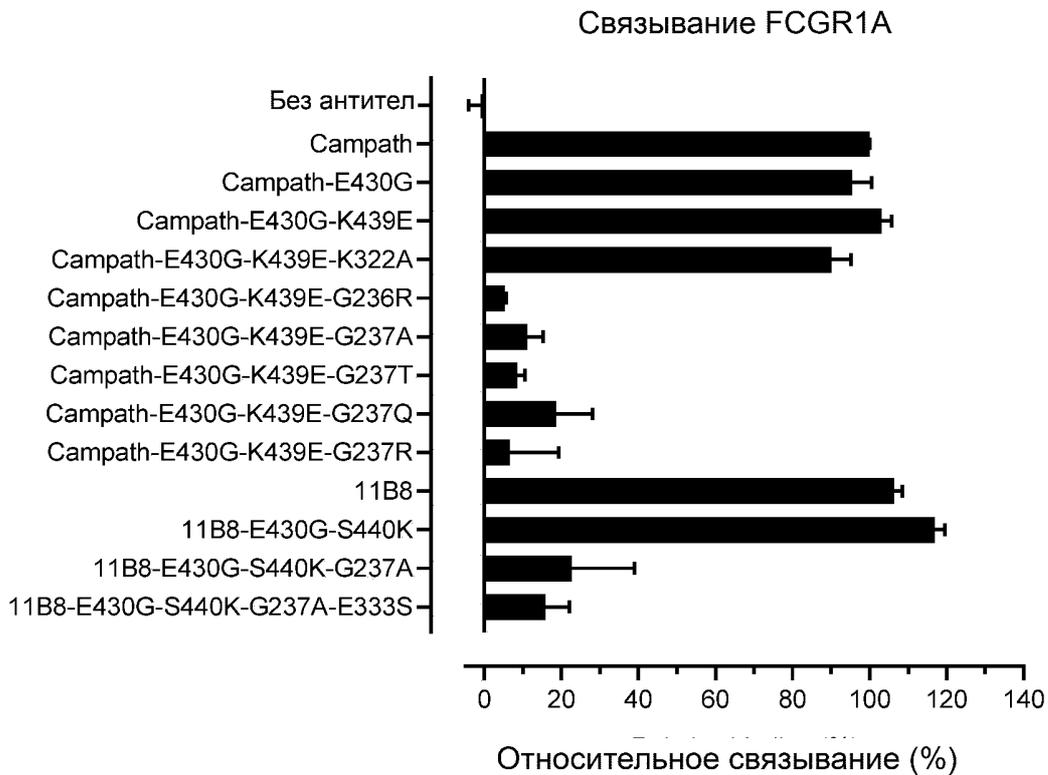


Фиг. 28 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

E



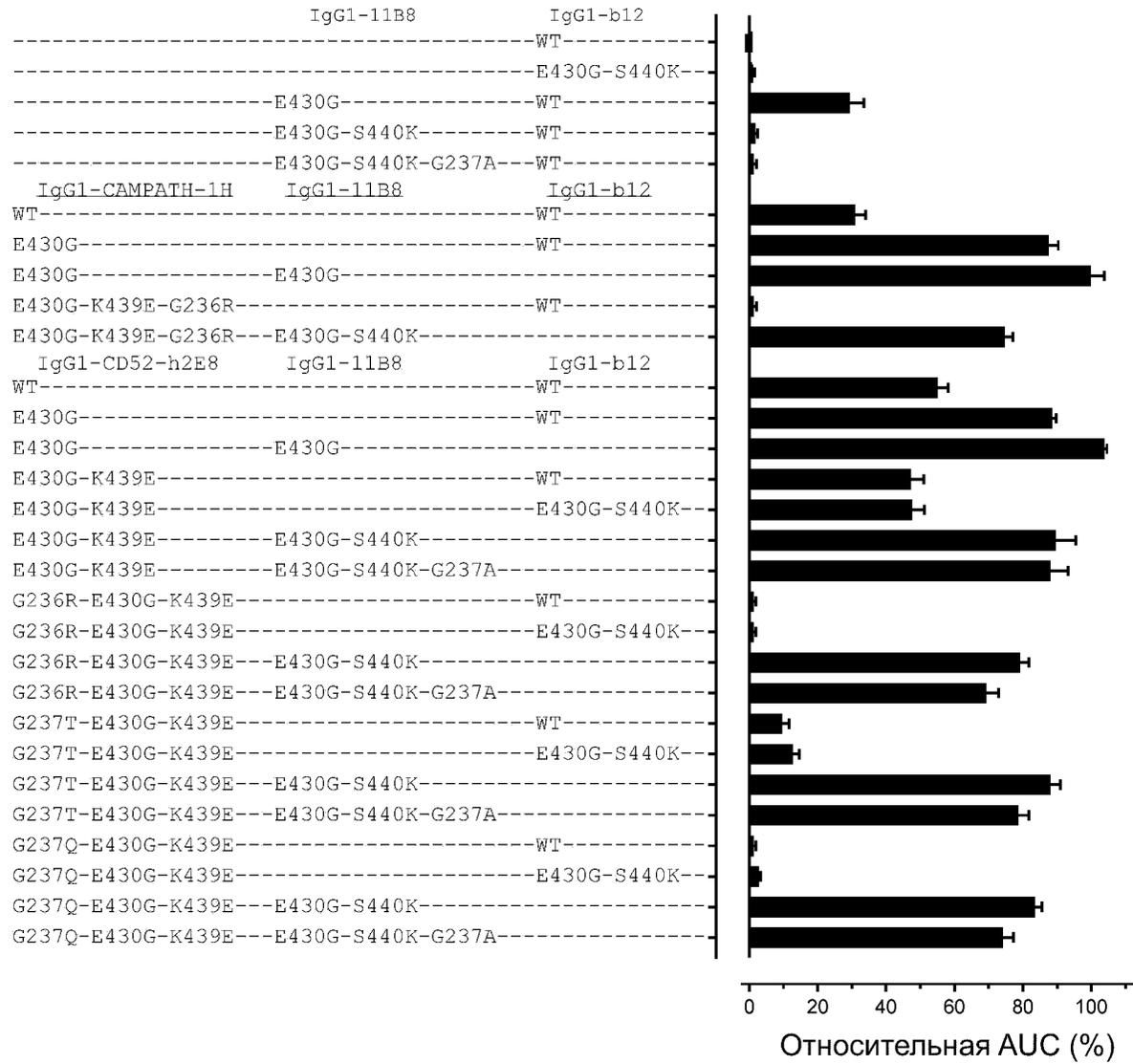
F



Фиг. 28 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

CDC - Wien 133

A

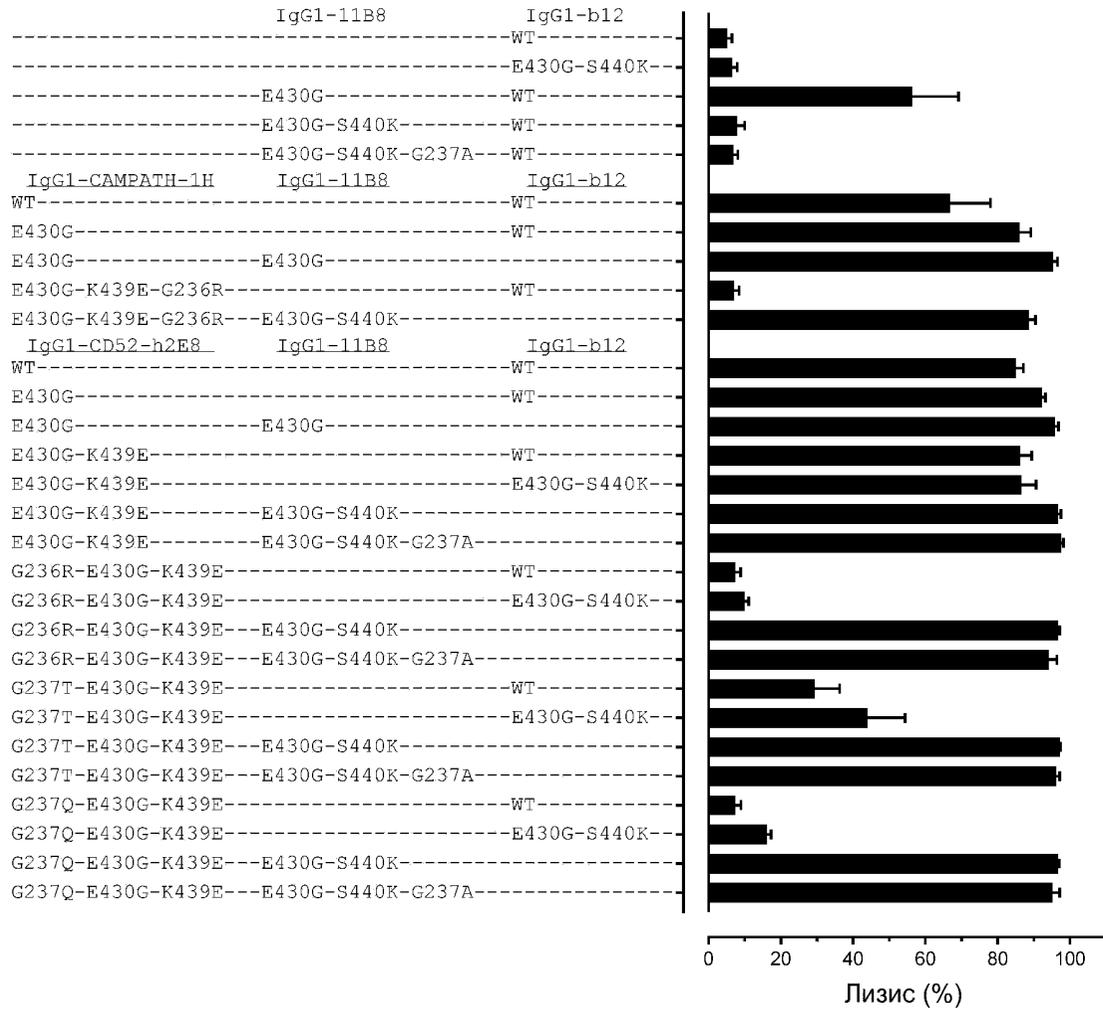


70/92

Фиг. 29

B

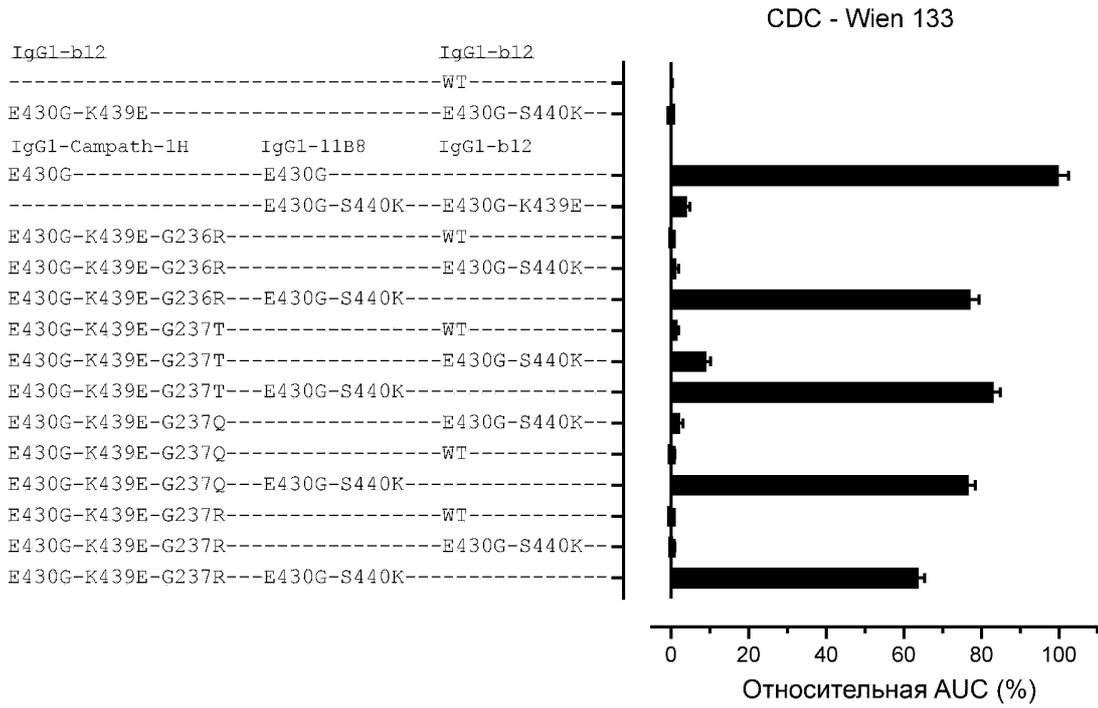
CDC - Wien 133



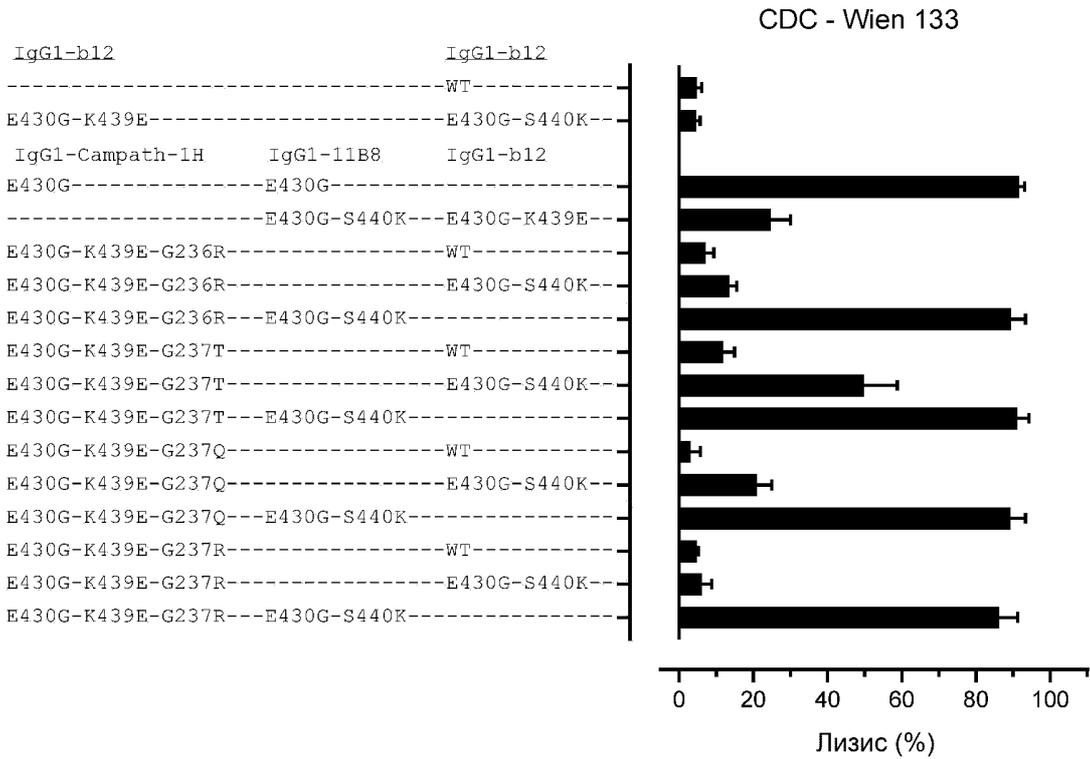
71/92

Фиг. 29 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

A

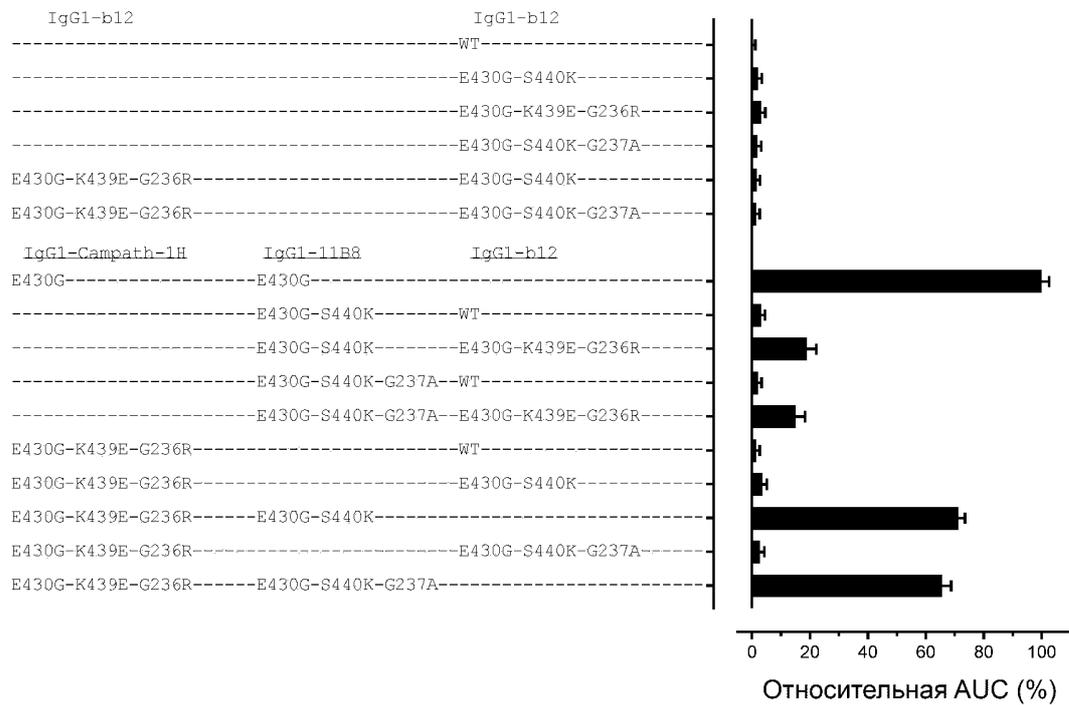


B

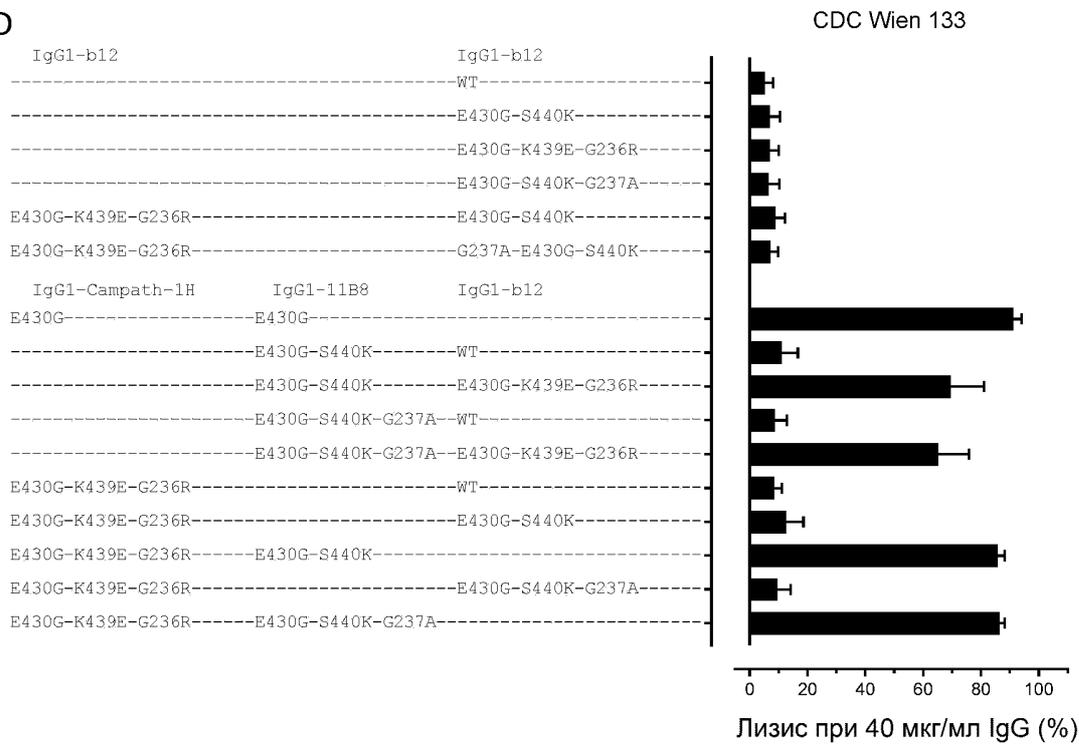


Фиг. 30

C



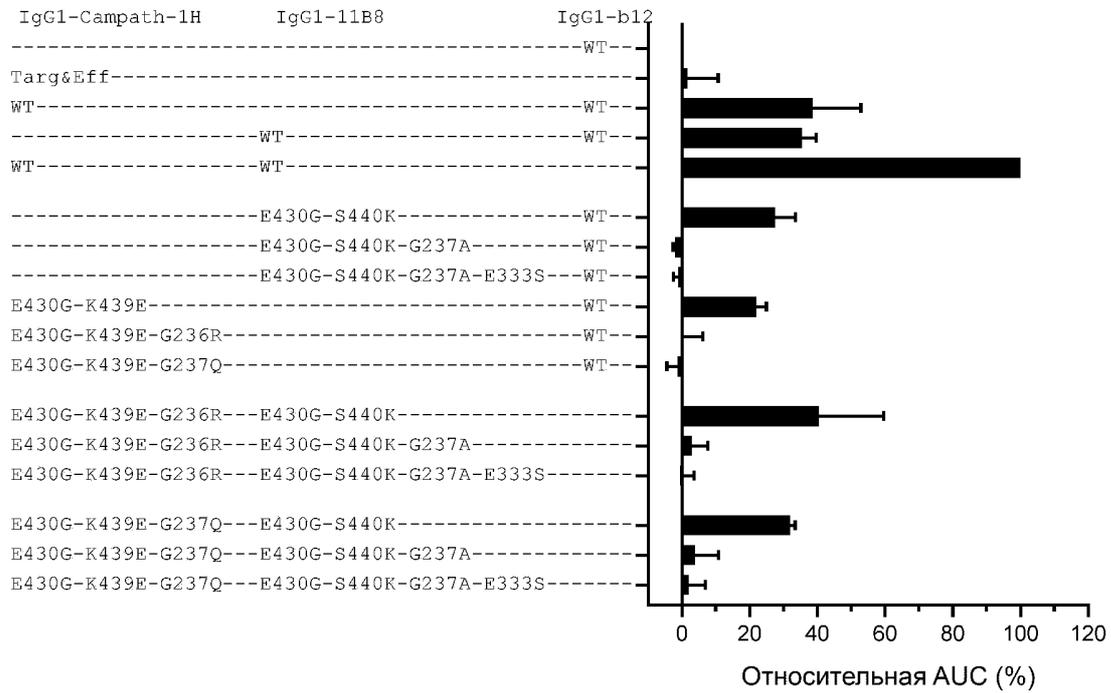
D



Фиг. 30 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

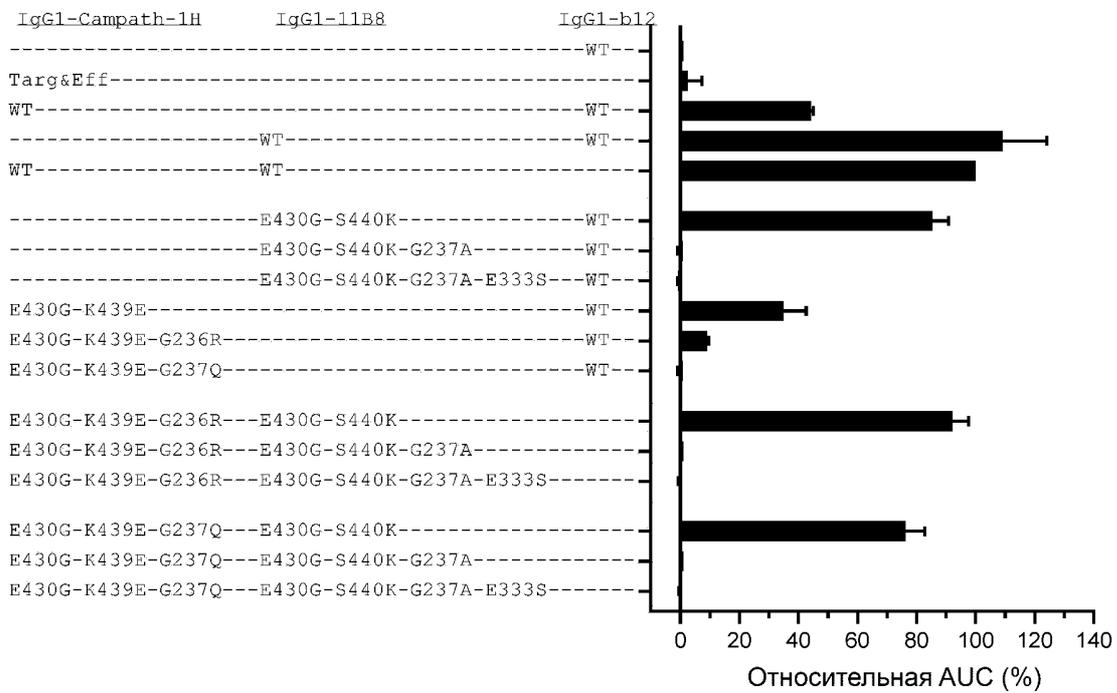
A

Репортерная активность FCGR2A

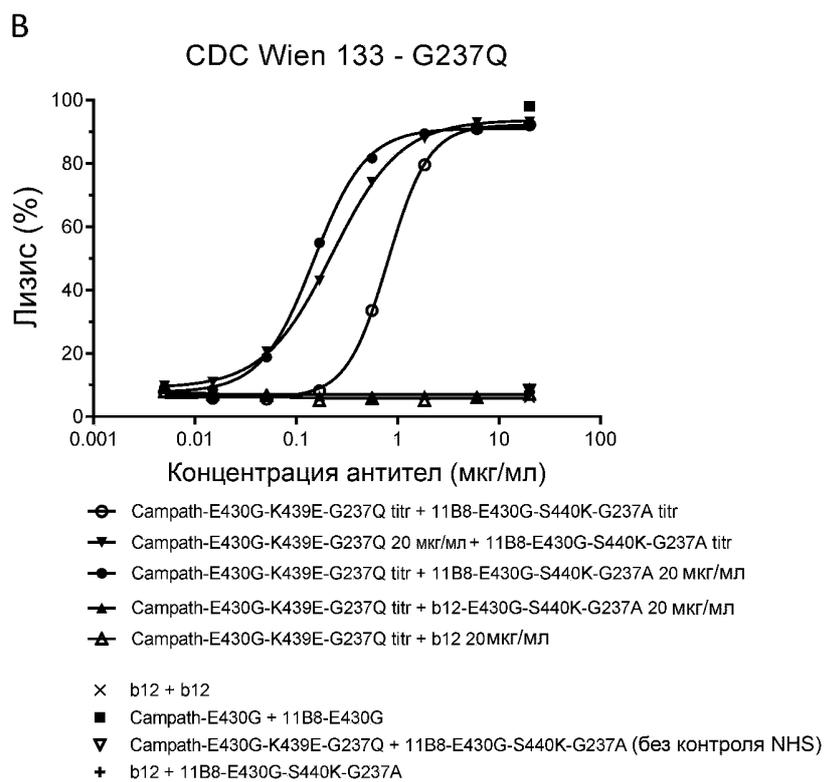
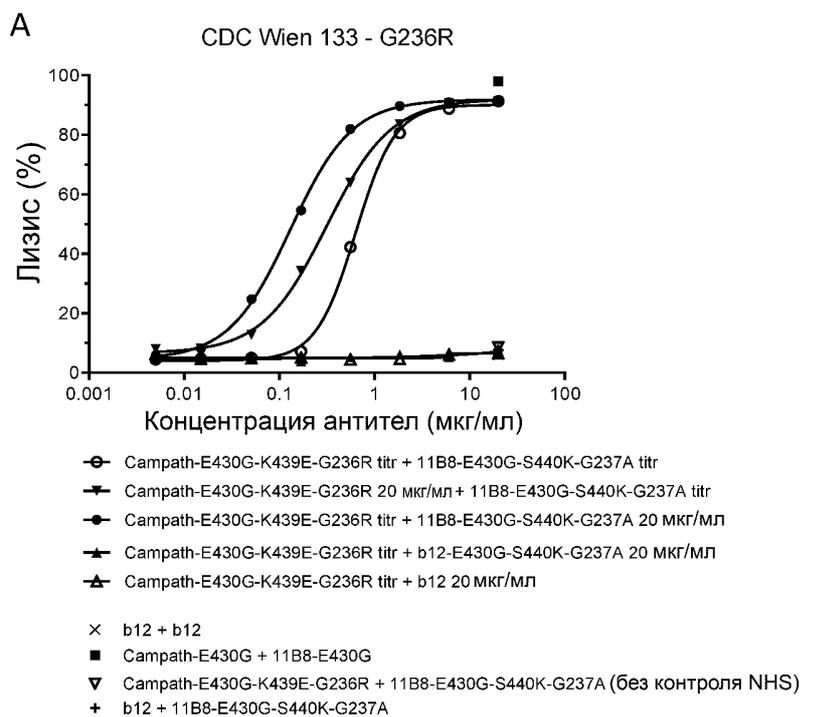


B

Репортерная активность FCGR3A

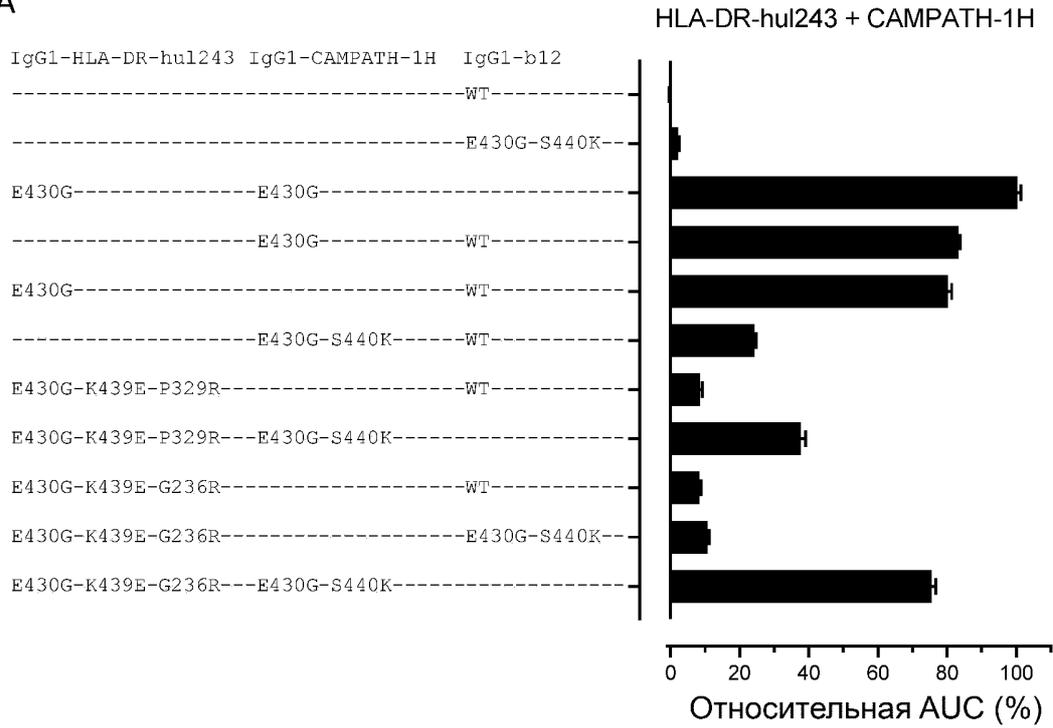


Фиг. 31

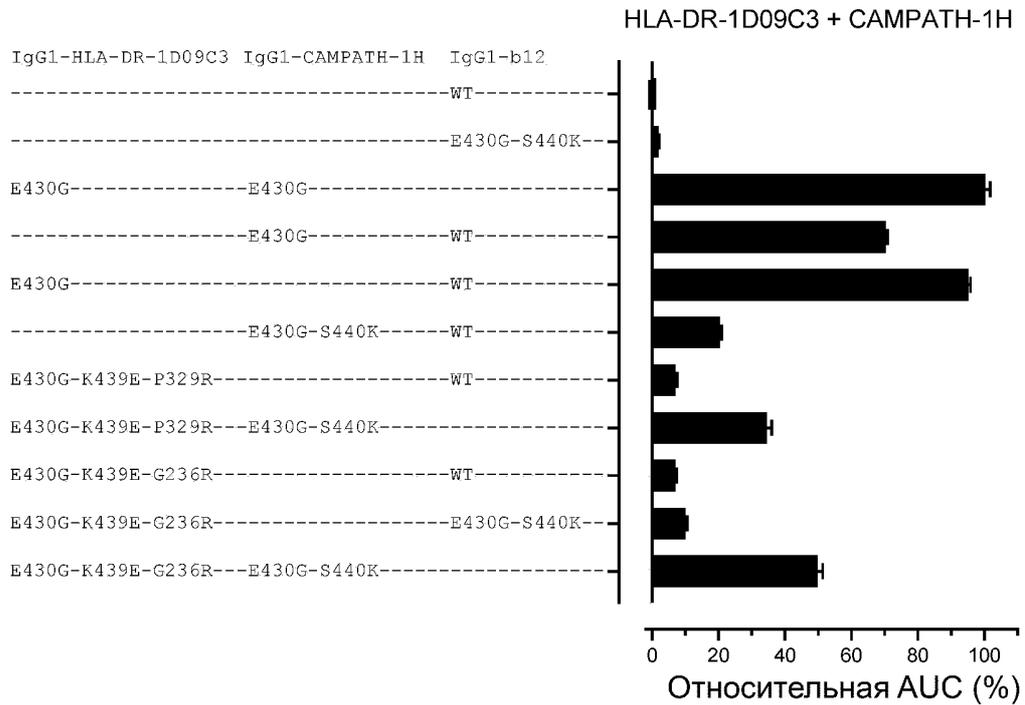


Фиг. 32

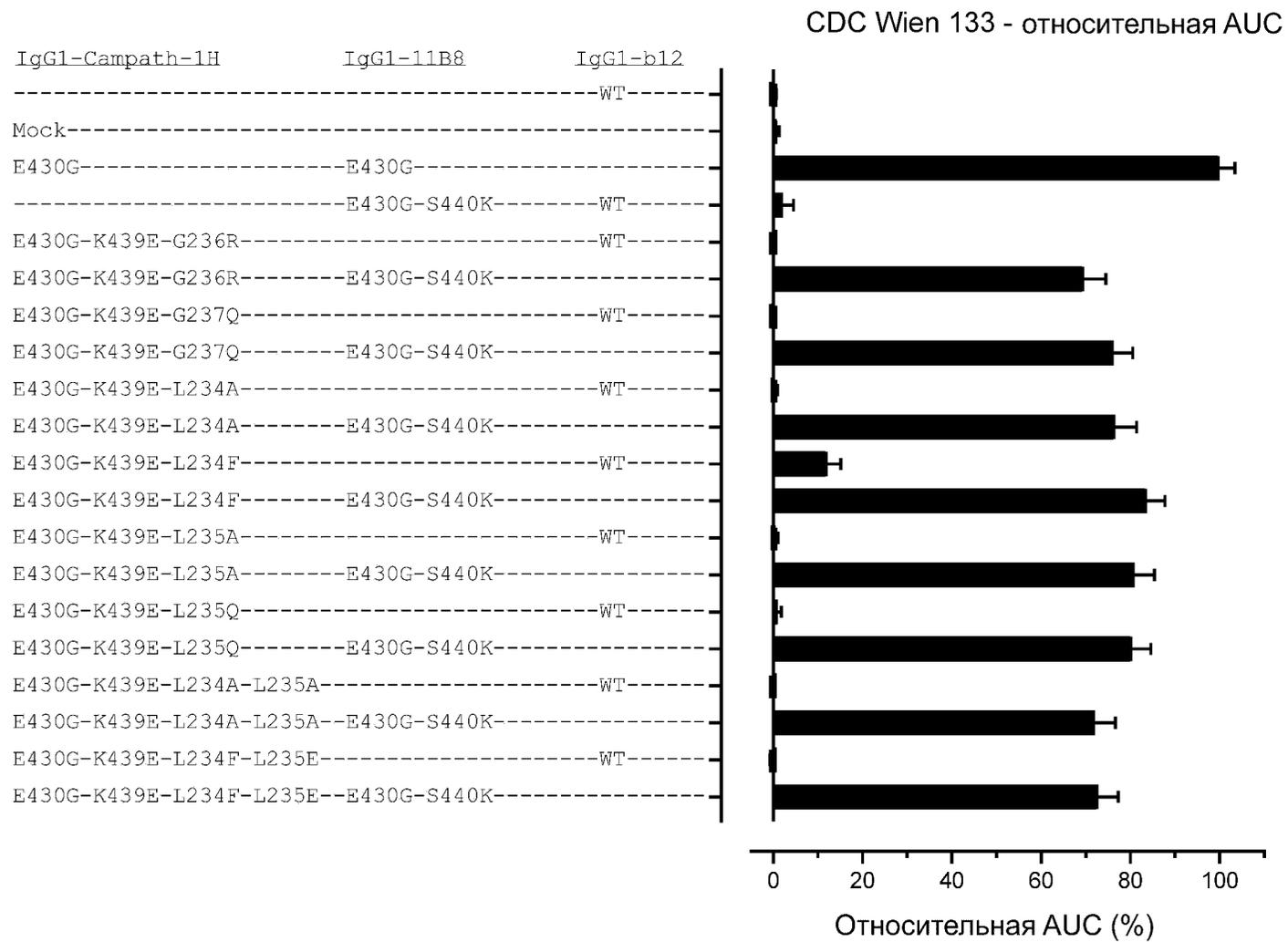
A



B



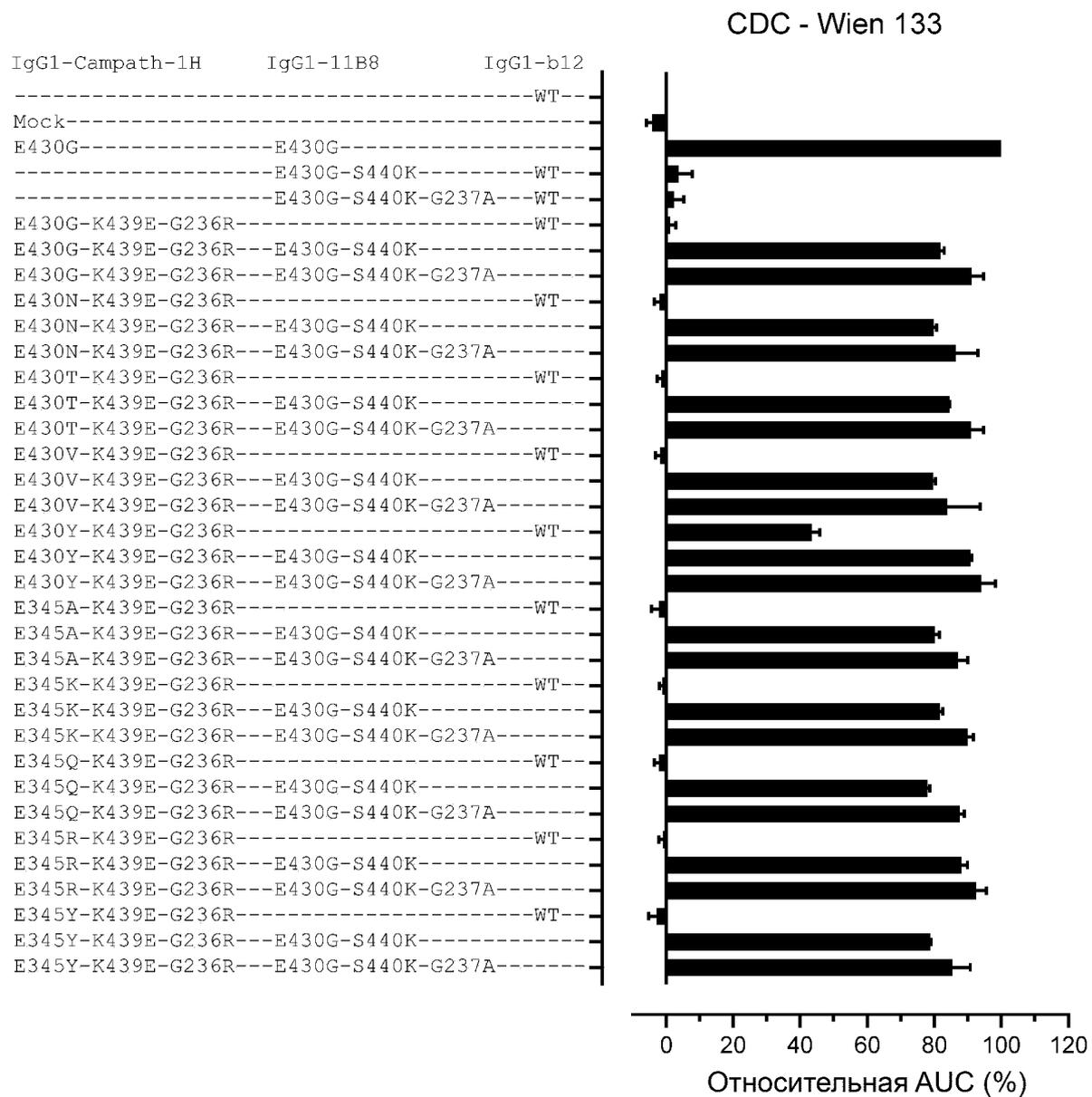
Фиг. 33



77/92

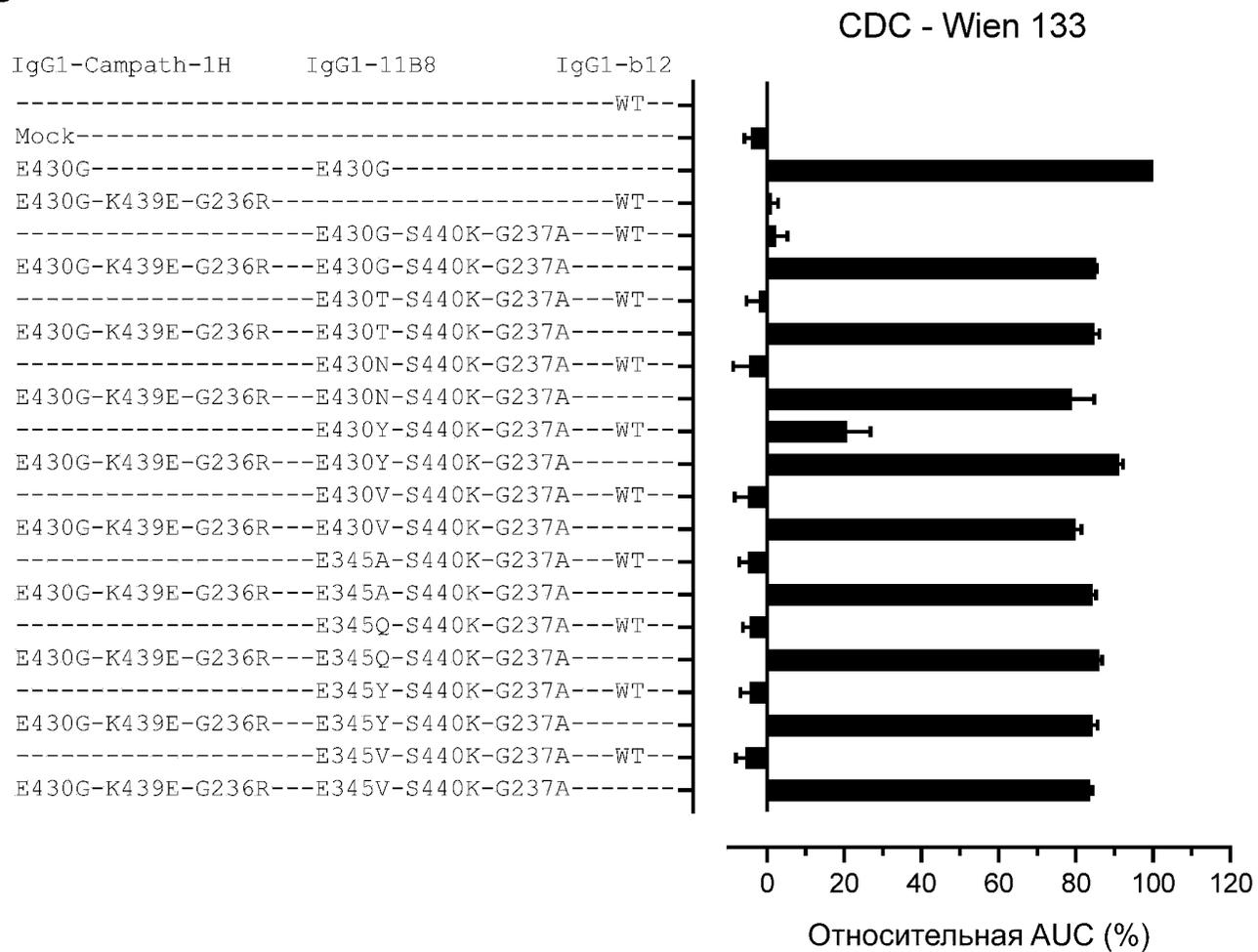
Фиг. 34

A



Фиг. 35

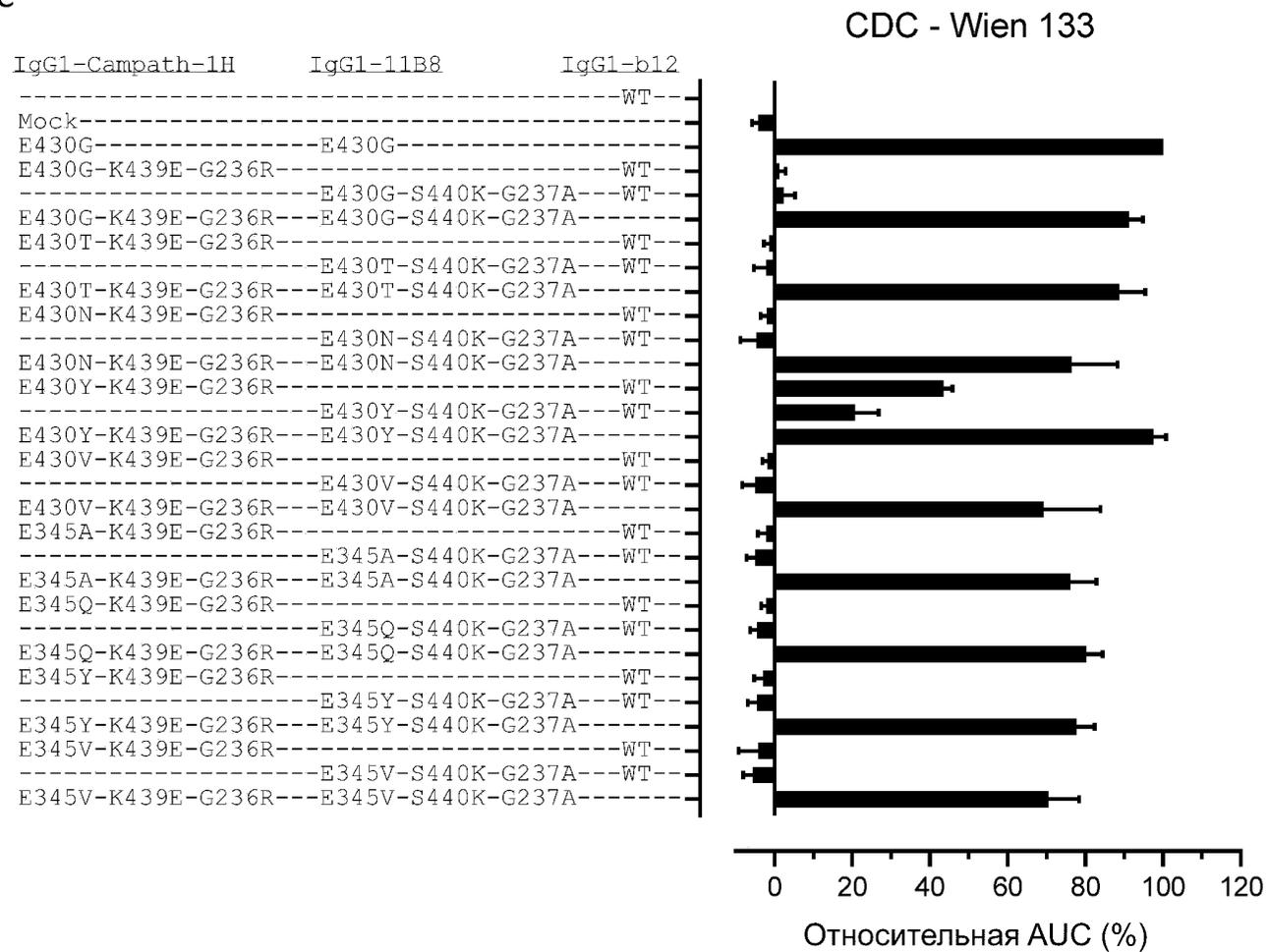
B



79/92

Фиг. 35 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

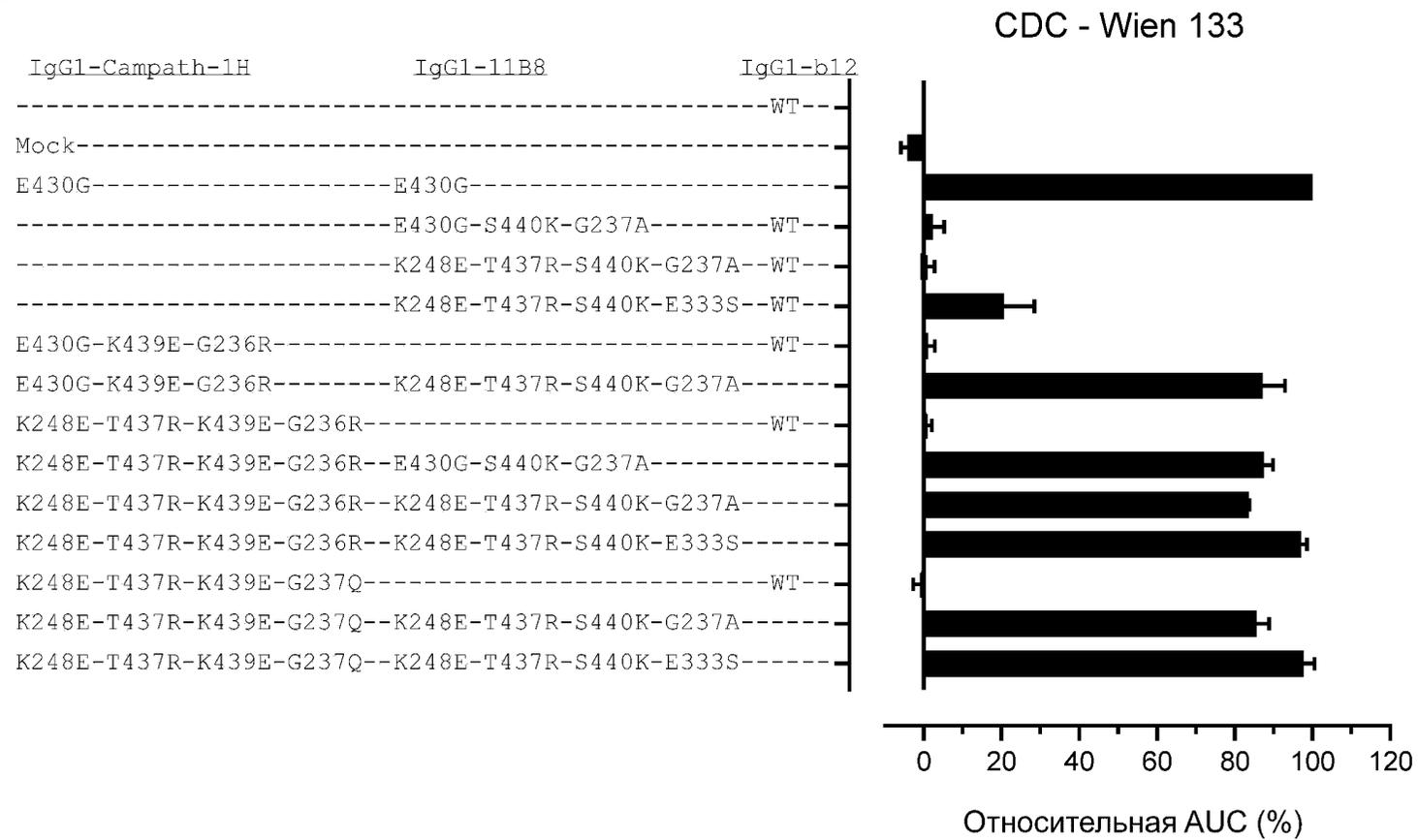
C



80/92

Фиг. 35 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

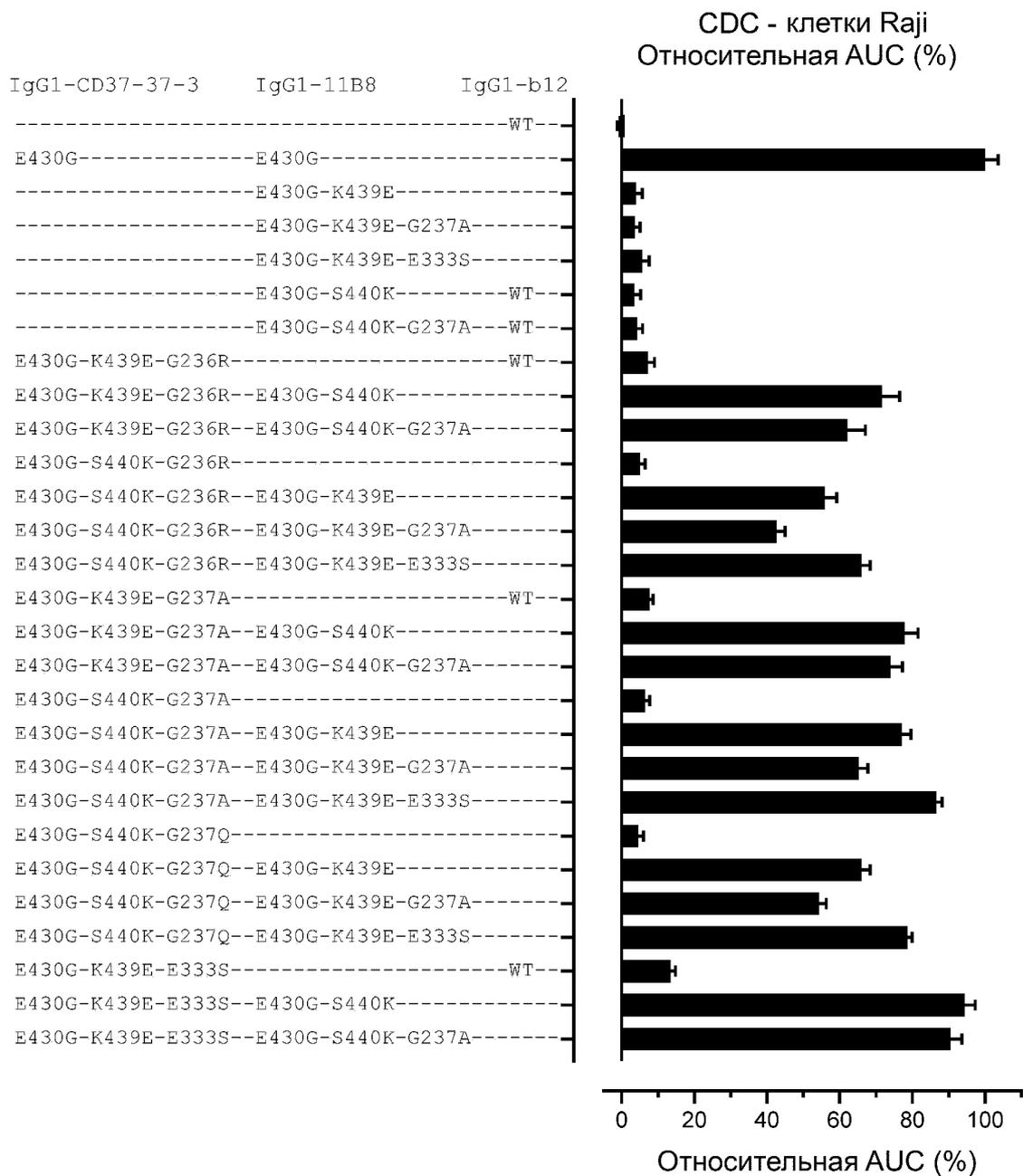
D



81/92

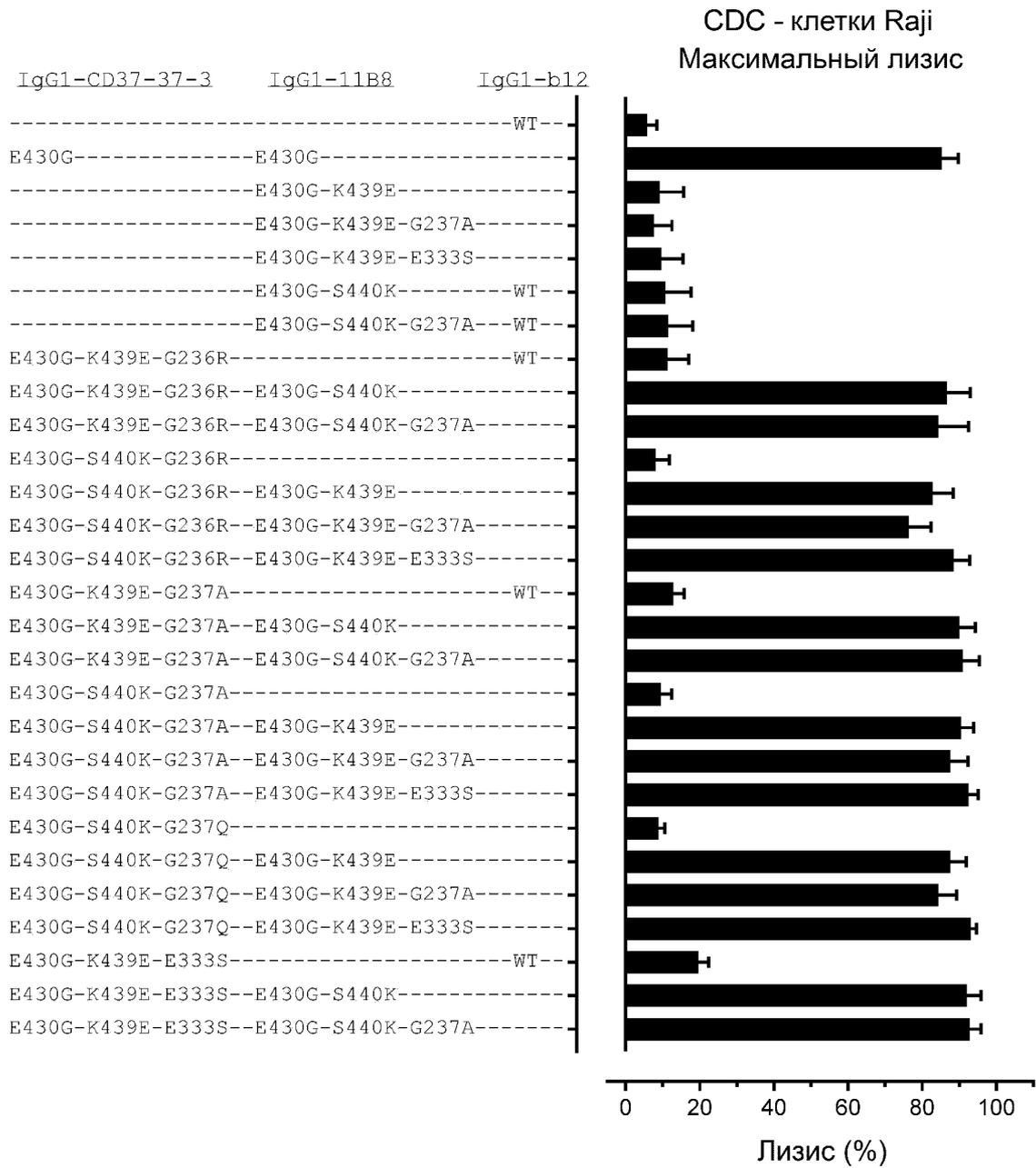
Фиг. 35 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

A



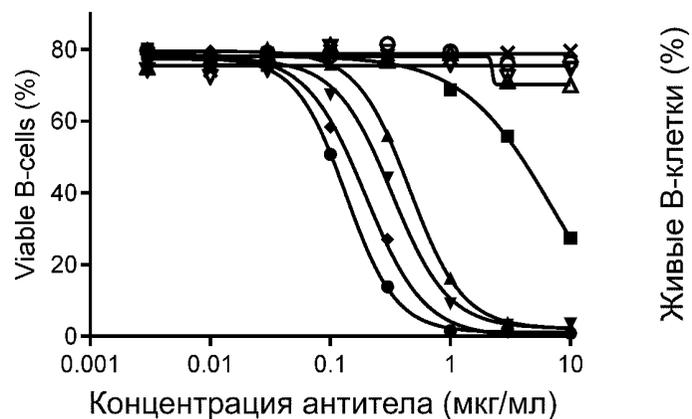
Фиг. 36

B



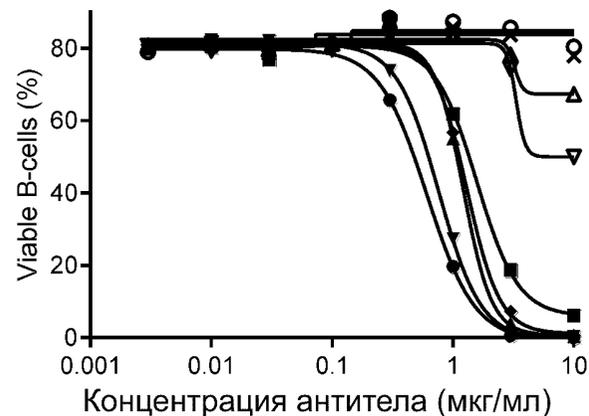
Фиг. 36 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

A CDC на клетках CLL, полученных из пациента Пациент 1



- ✱ IgG1-b12 + IgG1-b12
- IgG1-CD52-Campath-E430G + IgG1-11B8-E430G
- ◆ IgG1-CD52-Campath-E430G + IgG1-b12
- IgG1-b12 + IgG1-11B8-E430G
- IgG1-CD52-Campath-E430G-K439E-G236R + IgG1-b12
- ▲ IgG1-b12 + IgG1-11B8-E430G-S440K
- ★ IgG1-CD52-Campath-E430G-K439E-G236R + IgG1-11B8-E430G-S440K
- ▽ IgG1-b12 + IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S
- ▼ IgG1-CD52-Campath-E430G-K439E-G236R + IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S

B CDC на клетках CLL, полученных из пациента Пациент 2

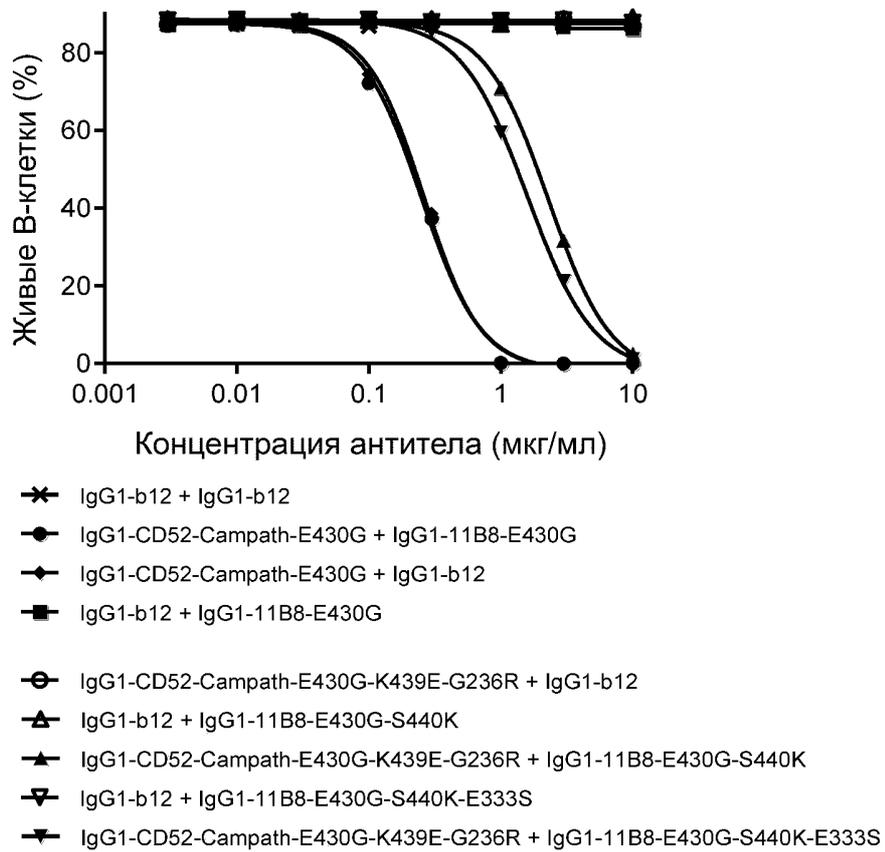


- ✱ IgG1-b12 + IgG1-b12
- IgG1-CD52-Campath-E430G + IgG1-11B8-E430G
- ◆ IgG1-CD52-Campath-E430G + IgG1-b12
- IgG1-b12 + IgG1-11B8-E430G
- IgG1-CD52-Campath-E430G-K439E-G236R + IgG1-b12
- ▲ IgG1-b12 + IgG1-11B8-E430G-S440K
- ★ IgG1-CD52-Campath-E430G-K439E-G236R + IgG1-11B8-E430G-S440K
- ▽ IgG1-b12 + IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S
- ▼ IgG1-CD52-Campath-E430G-K439E-G236R + IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S

Фиг. 37

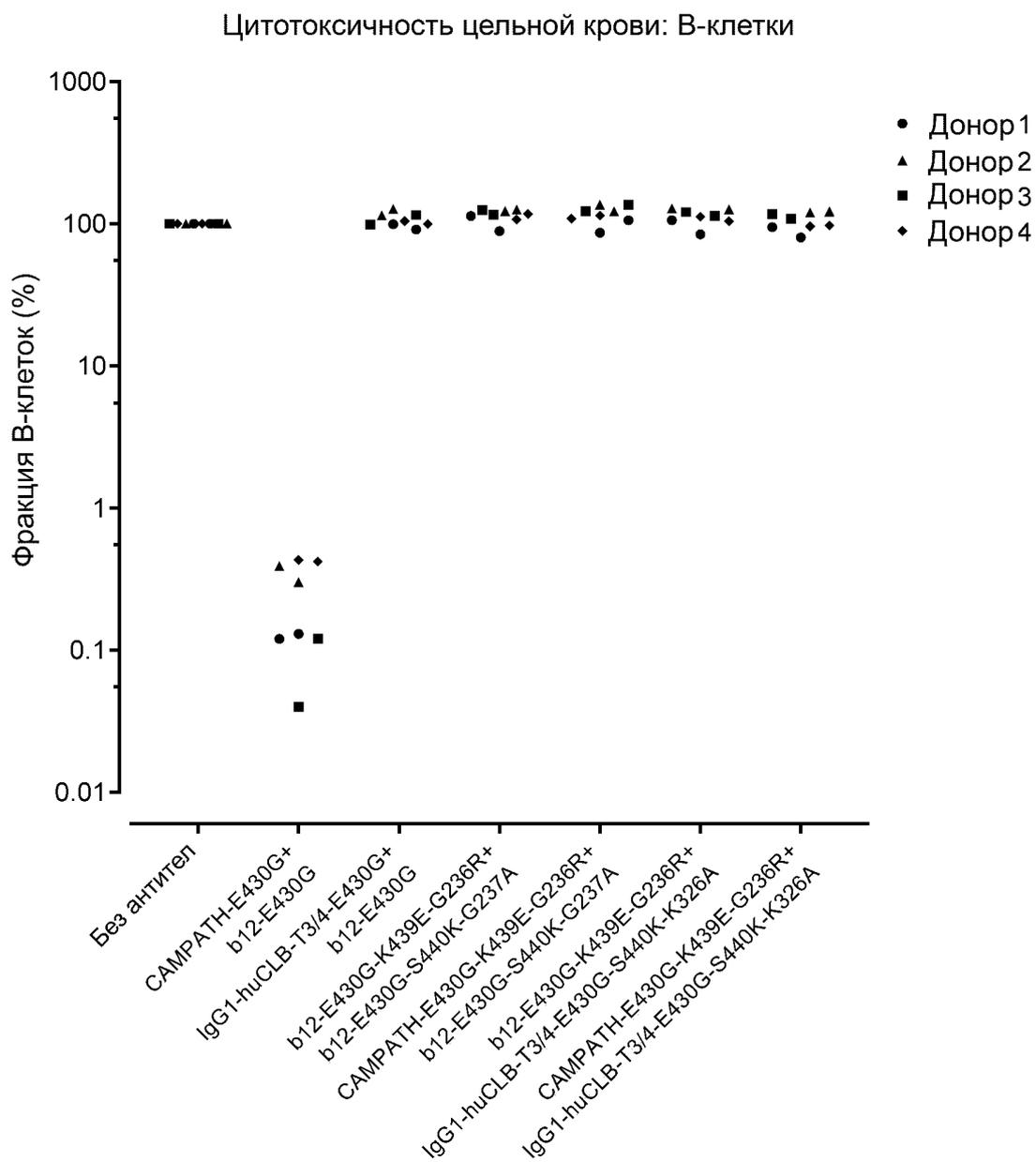
С CDC на клетках CLL, полученных из пациента

Пациент 3



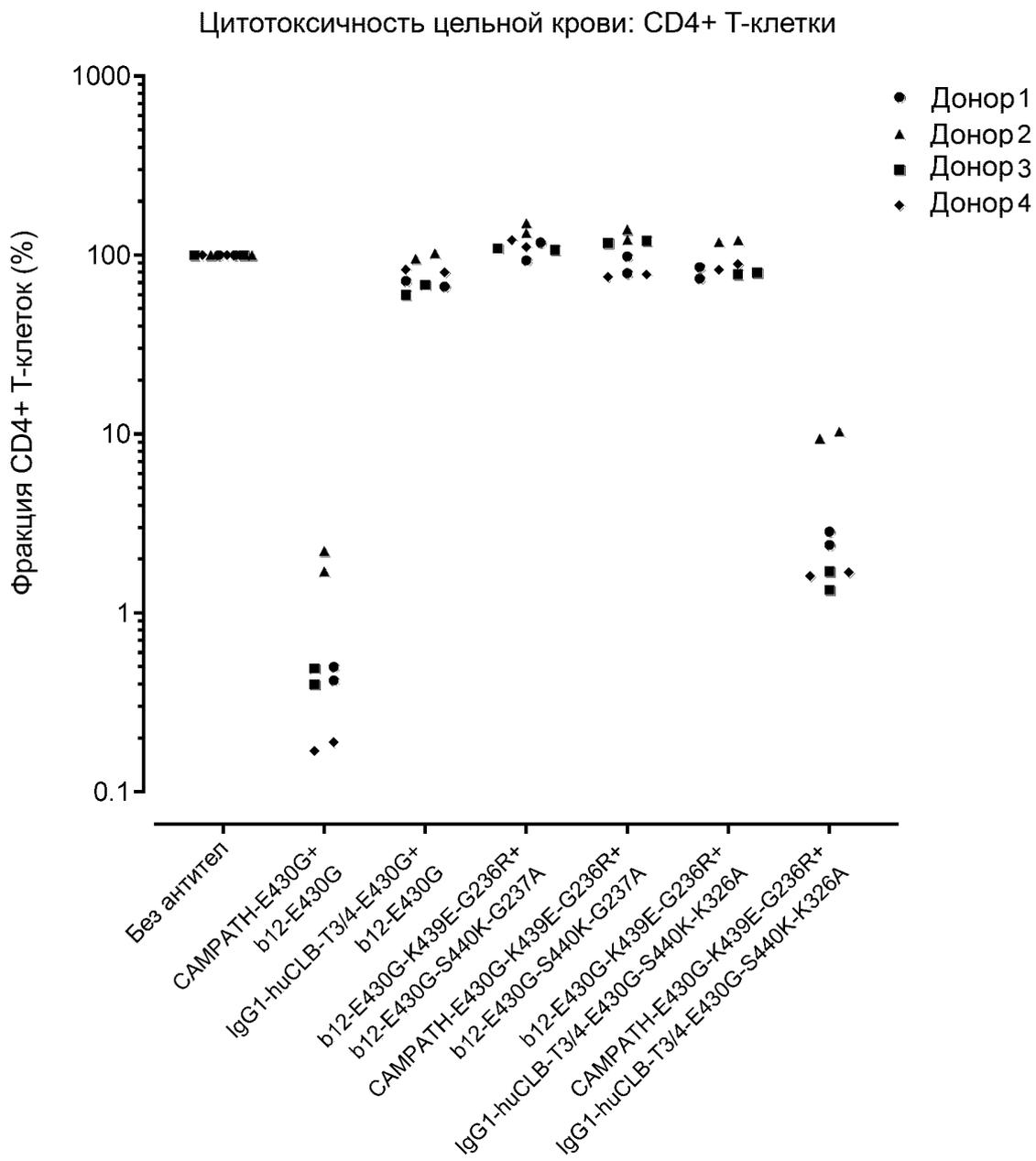
Фиг. 37 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

А



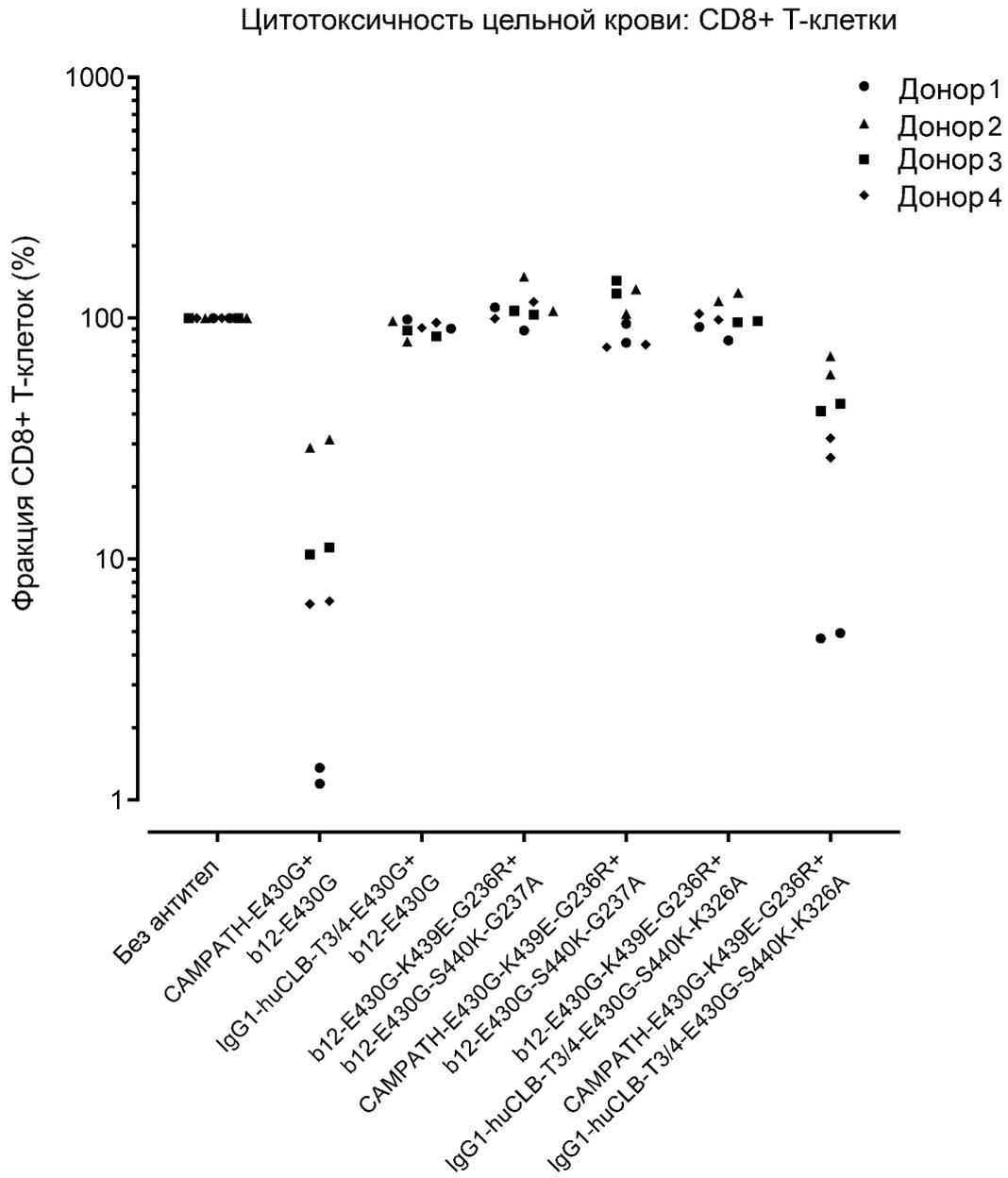
Фиг. 38

B



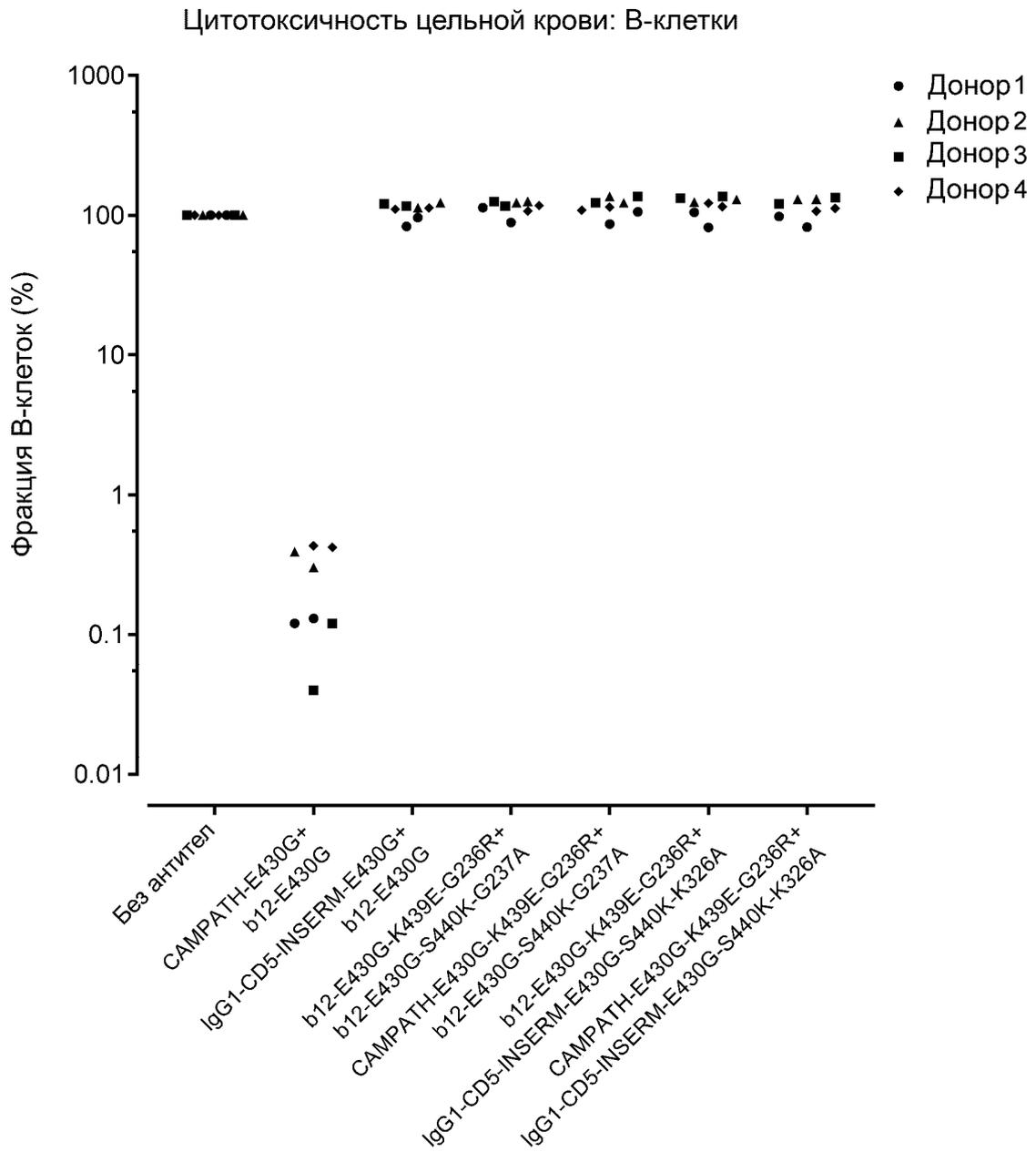
Фиг. 38 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

С



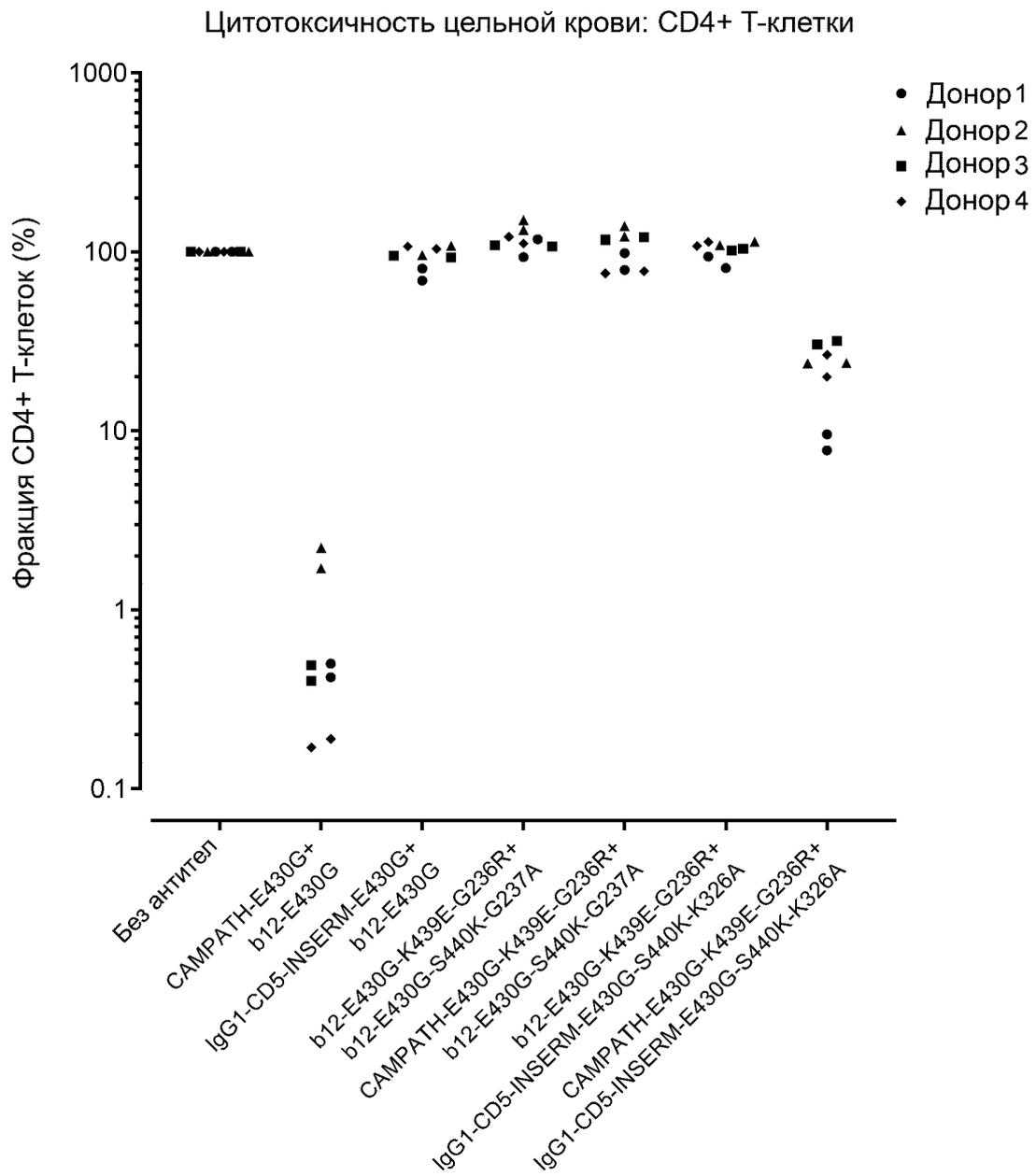
Фиг. 38 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

D



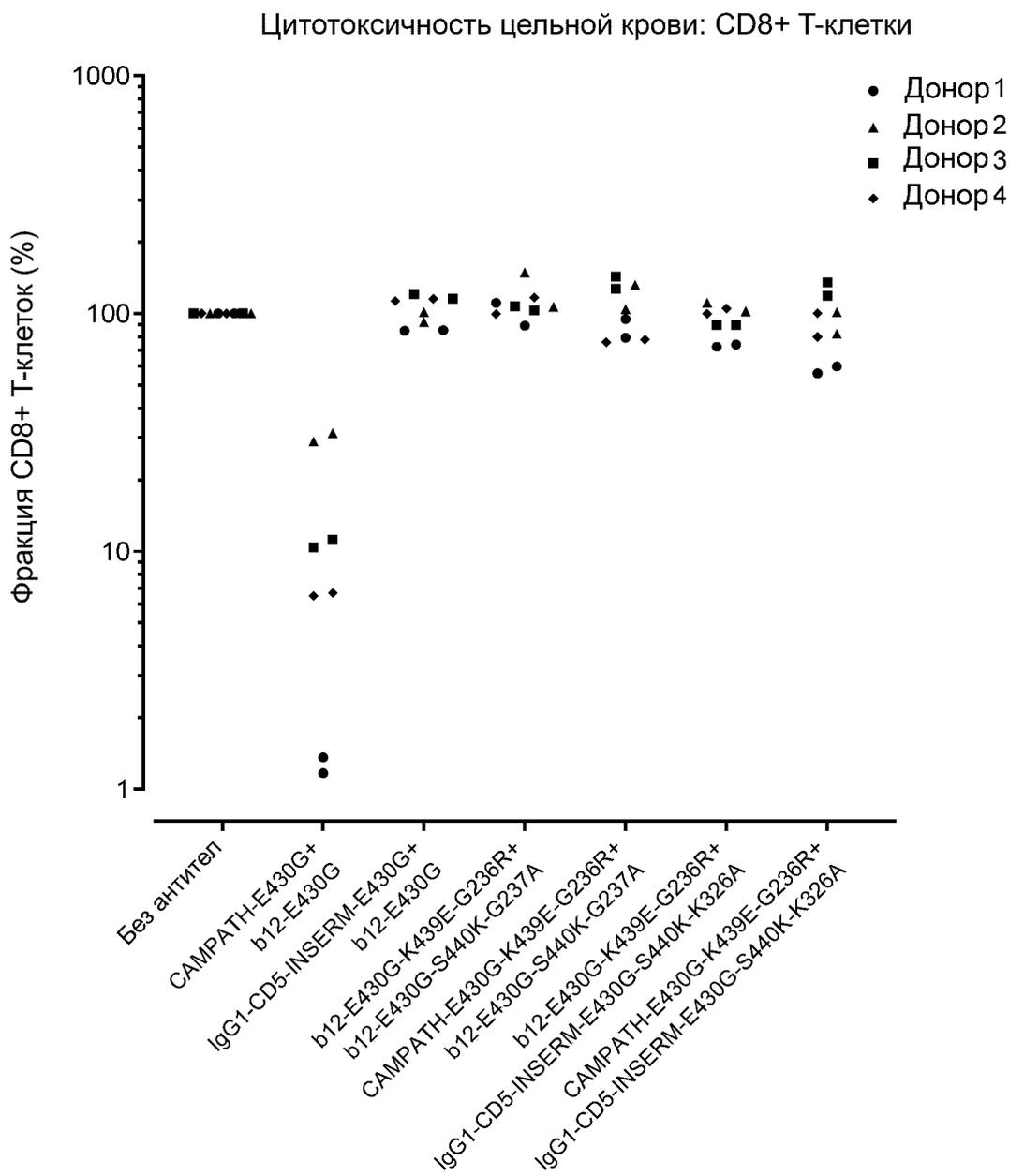
ФИГ. 38 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

E

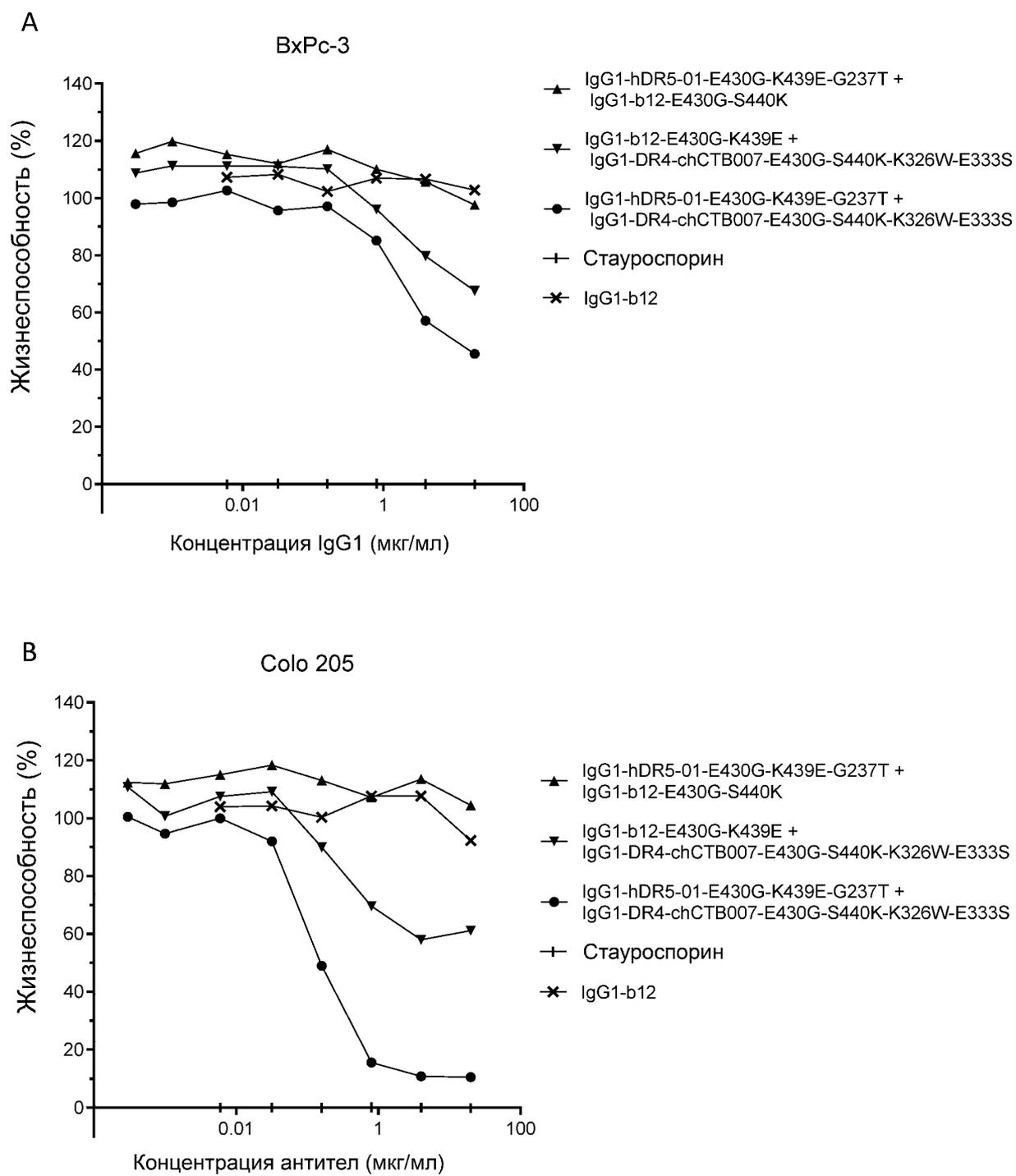


ФИГ. 38 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

F



Фиг. 38 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



Фиг. 39