



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК
C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2007109785/13, 19.08.2005

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
19.08.2005

(30) Конвенционный приоритет:
19.08.2004 US 60/603,057

(43) Дата публикации заявки: 27.09.2008

(45) Опубликовано: 20.09.2009 Бюл. № 26

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: WO 00/42072 A, 20.07.2000. RU 2169006 C1,
20.06.2001.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную
фазу: 19.03.2007

(86) Заявка РСТ:
US 2005/029511 (19.08.2005)

(87) Публикация РСТ:
WO 2006/031370 (23.03.2006)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городиский и
Партнеры", пат.пов. А.В.Мишу

(72) Автор(ы):

ЛОУМЭН Генри Б. (US),
АДАМС Камеллия В. (US),
МАРВИН Джонатан С. (US),
ЛИН Саманта (US),
МЭН Юй-Цзюй Г. (US)

(73) Патентообладатель(и):

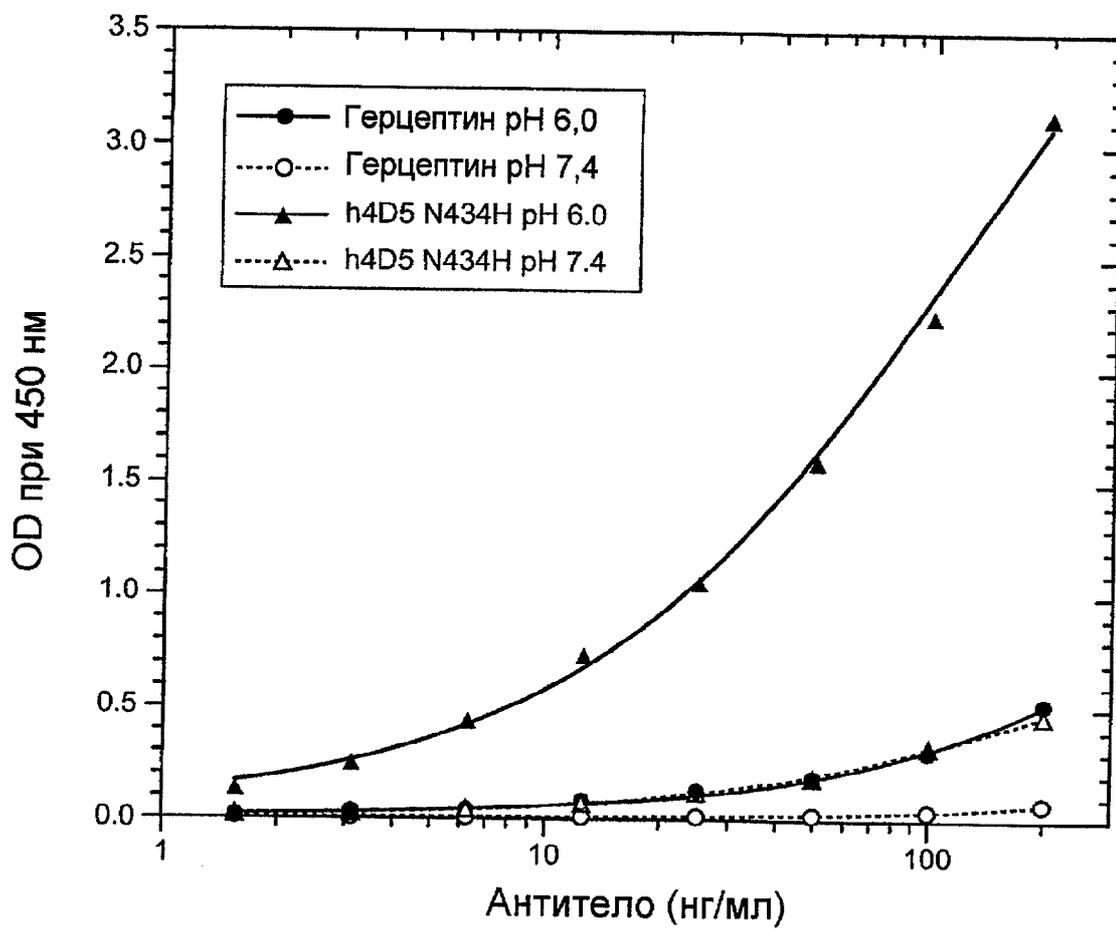
ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)

(54) ПОЛИПЕПТИДНЫЕ ВАРИАНТЫ С ИЗМЕНЕННОЙ ЭФФЕКТОРНОЙ ФУНКЦИЕЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Описаны варианты полипептида, содержащие Fc-области IgG, имеющие аминокислотные модификации, придающие указанным полипептидам измененные эффекторные функции Fc. Раскрыта композиция для нацеливания антитела на антиген, содержащая указанный полипептид. Описан способ получения указанного полипептида. Также описаны способы лечения В-клеточной опухоли или злокачественного заболевания, характеризующихся

экспрессией CD20 В-клетками, лечения хронического лимфоцитарного лейкоза, ослабления симптомов В-клеточного регулируемого аутоиммунного заболевания, лечения расстройства, связанного с ангиогенезом, лечения HER2-экспрессирующей раковой опухоли, лечения LFA-1-опосредуемого расстройства, лечения IgE-опосредуемого расстройства, где указанные способы включают введение пациенту терапевтически эффективного количества указанного полипептида. 36 н. и 27 з.п. ф-лы, 13 ил., 12 табл.



Фиг. 13



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **2007109785/13, 19.08.2005**

(24) Effective date for property rights:
19.08.2005

(30) Priority:
19.08.2004 US 60/603,057

(43) Application published: **27.09.2008**

(45) Date of publication: **20.09.2009 Bull. 26**

(85) Commencement of national phase: **19.03.2007**

(86) PCT application:
US 2005/029511 (19.08.2005)

(87) PCT publication:
WO 2006/031370 (23.03.2006)

Mail address:
**129090, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. A.V.Mitsu**

(72) Inventor(s):

**LOUMehN Genri B. (US),
ADAMS Kamellija V. (US),
MARVIN Dzhonatan S. (US),
LIN Samanta (US),
MEhN Juj-Tszjuz G. (US)**

(73) Proprietor(s):

DZhENENTEK, INK. (US)

(54) POLYPEPTIDE VARIANTS WITH CHANGED EFFECTOR FUNCTION

(57) Abstract:

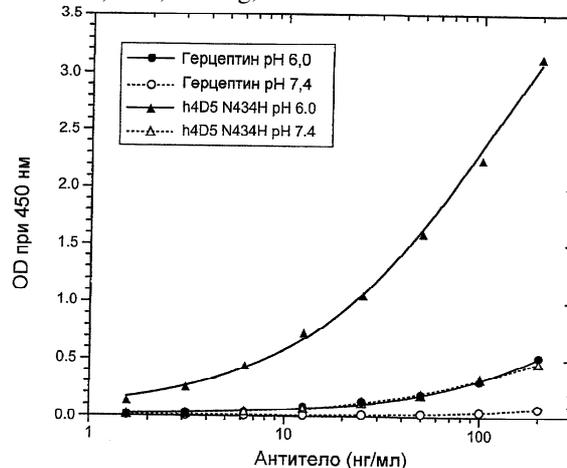
FIELD: medicine.

SUBSTANCE: there are disclosed polypeptide variants containing Fc-areas IgG, having amino acid modifications providing changed effector functions Fc in specified polypeptides. There is disclosed composition for antibody targeting on antigen, containing the specified polypeptide. There is described method for preparing the specified polypeptide. Also, there are disclosed the methods for treating V-cell tumour or a malignant disease characterised by V-cell expression of CD20, treating chronic lymphocytic leukosis, relieving the symptoms of the V-cell controlled autoimmune disease, treating an angiogenesis-associated disorder, treating HER2-expressing cancer, treating LFA-1-mediated involvement, treating IgE-mediated involvement wherein specified methods imply introduction to the

patient of the therapeutically effective amount of said polypeptide.

EFFECT: higher clinical effectiveness.

63 cl, 6 ex, 13 dwg, 10 tbl



Фиг. 13

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки, рег.№ 60/603057, поданной 19 августа 2004, описание которой вводится в настоящее изобретение посредством ссылки.

Область, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к полипептидам, содержащим вариант Fc-области. Более конкретно, настоящее изобретение относится к содержащим Fc-область полипептидам, которые обладают эффекторной функцией, измененной в результате одной или нескольких аминокислотных модификаций, внесенных в их Fc-область.

Предшествующий уровень техники

Антитела представляют собой белки, обладающие специфичностью связывания с конкретным антигеном. Природными антителами обычно являются гетеротетрамерные гликопротеины размером приблизительно 150000 Дальтон, состоящие из двух одинаковых легких цепей (L) и двух одинаковых тяжелых цепей (H). Каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, при этом число дисульфидных связей между тяжелыми цепями иммуноглобулинов различных изоформ варьируется. Каждая тяжелая и легкая цепь также имеет соответствующим образом расположенные внутрицепевые дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь у одного своего конца имеет переменный домен (V_H), за которым следует ряд константных доменов. Каждая легкая цепь у одного своего конца имеет переменный домен (V_L), а у другого конца - константный домен, причем, константный домен легкой цепи соответствует первому константному домену тяжелой цепи, а переменный домен легкой цепи соответствует переменному домену тяжелой цепи. Очевидно, что конкретные аминокислотные остатки образуют пограничную область между переменными доменами легкой и тяжелой цепи.

Термин “переменный” означает, что некоторые части переменных доменов у различных антител очень отличаются по своим последовательностям и являются ответственными за специфическое связывание каждого конкретного антитела с конкретным антигеном. Однако такая переменность не одинаково распределяется по всем переменным доменам антител. Указанная переменность сконцентрирована в трех сегментах, называемых гиперпеременными областями (комплементарность-определяющими областями (CDR)), присутствующими в переменных доменах как легкой, так и тяжелой цепи. Более высококонсервативные части указанных переменных доменов называются каркасными областями (FR). Каждый переменный домен природных тяжелой и легкой цепей содержит четыре FR, что в значительной степени способствует формированию β -складчатой структуры, соединенной тремя CDR, образующими петли и соединяющими, а в некоторых случаях, составляющими части такой β -складчатой структуры. CDR в каждой цепи находятся в непосредственной близости друг от друга благодаря FR, а вместе с CDR другой цепи они образуют антигенсвязывающий сайт антител (см. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)).

Константные домены не принимают непосредственного участия в связывании антитела с антигеном, но обладают различными эффекторными функциями. Антитела или иммуноглобулины, в зависимости от аминокислотной последовательности константной области их тяжелых цепей, могут быть подразделены на различные классы. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG

и IgM, некоторые из которых могут быть дополнительно подразделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4; и IgA1 и IgA2. Константные области тяжелой цепи, которые соответствуют иммуноглобулинам различных классов, обозначаются α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Известно, что из этих классов иммуноглобулинов человека только иммуноглобулины IgG1, IgG2, IgG3 и IgM человека активируют комплемент, причем IgG1 и IgG3 человека опосредуют ADCC более эффективно, чем IgG2 и IgG4.

Структура природного IgG1 схематически представлена на фиг.1, где показаны различные части молекулы природного антитела. В результате расщепления антител папаином образуются два одинаковых антигенсвязывающих фрагмента, называемые Fab-фрагментами, каждый из которых имеет один антигенсвязывающий сайт и один остаточный "Fc"-фрагмент, обозначение которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Была определена кристаллическая структура Fc-области IgG человека (Deisenhofer, Biochemistry 20:2361-2370 (1981)). В молекулах IgG человека, Fc-область образуется в результате расщепления папаином на участке, расположенном у N-конца перед Cys226. Указанная Fc-область играет ключевую роль в осуществлении эффекторных функций антител.

Эффекторные функции антител

Эффекторные функции, опосредуемые Fc-областью антитела, могут быть подразделены на две категории: (1) эффекторные функции, которые действуют после связывания антитела с антигеном (такими функциями являются участие в каскаде реакций активации комплемента или лизис клеток, несущих Fc-рецептор (FcR)); и (2) эффекторные функции, осуществляемые независимо от связывания с антигеном (эти функции обеспечивают длительное присутствие антитела в кровотоке и способность этого антитела проникать через клеточные барьеры посредством трансцитоза). См. Ward & Ghetie, Therapeutic Immunology 2:77-94 (1995).

Хотя связывание антитела с требуемым антигеном дает нейтрализующий эффект, который может предупреждать связывание чужеродного антигена с его эндогенной мишенью (например, с рецептором или лигандом), однако, только одно такое связывание не может приводить к удалению этого чужеродного антигена. Для эффективной элиминации и/или деструкции чужеродных антигенов антитело должно обладать высокой аффинностью связывания с антигеном и эффективными эффекторными функциями.

Взаимодействие антител и комплексов "антитело-антиген" с клетками иммунной системы приводит к продуцированию различных ответов, включая антитело-зависимую клеточноопосредуемую цитотоксичность (ADCC) и комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC)(описанные в публикации Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997); Ward & Ghetie, Therapeutic Immunol. 2:77-94 (1995), а также в публикации Ravetch & Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)).

Некоторые эффекторные функции антитела опосредуются Fc-рецепторами (FcR), которые связываются с Fc-областью антитела. FcR определяются их специфичностью к иммуноглобулинам различных изотипов; причем Fc-рецепторы для антител IgG обозначаются Fc γ R, для IgE - Fc ϵ R, а для IgA - Fc α R и т.д. Были идентифицированы три подкласса Fc γ R: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) и Fc γ RIII (CD16). Поскольку Fc γ R каждого подкласса кодируется двумя или тремя генами, а альтернативный РНК-сплайсинг приводит к образованию множества транскриптов, то существует широкое разнообразие изоформ Fc γ R. Три гена, кодирующие рецепторы подкласса Fc γ RI (Fc γ RIA, Fc γ RIB и Fc γ RIC), образуют кластеры в области 1q21.1 длинного плеча

хромосомы 1, а гены, кодирующие изоформы Fc γ RII (Fc γ RIIA, Fc γ RIIB и Fc γ RIIC), и два гена, кодирующие изоформы Fc γ RIII (Fc γ RIIIA и Fc γ RIIIB), образуют кластеры в области 1q22. Указанные FcR различных изотипов экспрессируются на клетках различных типов (см. публикацию Ravetch & Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991)). Так, например, у человека, Fc γ RIIIB присутствует только на нейтрофилах, тогда как Fc γ RIIIA присутствует на макрофагах, моноцитах, природных клетках-киллерах (NK) и в субпопуляции Т-клеток.

По своей структуре, все Fc γ R являются членами суперсемейства иммуноглобулинов, имеющих IgG-связывающую α -цепь вместе с внеклеточной частью, состоящей из любых двух (Fc γ RI- и Fc γ RIII)- или трех (Fc γ RI)-Ig-подобных доменов. Кроме того, Fc γ RI и Fc γ RIII имеют дополнительные белковые цепи ((γ , ζ), связанные с α -цепью, которая обеспечивает передачу сигнала. Эти рецепторы также различаются по своей аффинности связывания с IgG. Fc γ RI обладает высокой аффинностью связывания с IgG, $K_a = 10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1}$ (Ravetch et al., *Ann. Rev. Immunol.* 19:275-290 (2001)) и может связываться с мономерным IgG. В противоположность этому, Fc γ RII и Fc γ RIII обладают относительно более слабой аффинностью связывания с мономерным IgG, $K_a = 10^7 \text{ M}^{-1}$ (Ravetch et al., *Ann. Rev. Immunol.* 19:275-290 (2001)), а поэтому они могут эффективно взаимодействовать только с мультимерными иммунными комплексами. Fc γ RII-рецепторами являются Fc γ RIIA (“активирующий рецептор”) и Fc γ RIIB (“ингибирующий рецептор”), которые имеют сходные аминокислотные последовательности, отличающиеся, главным образом, своими цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор Fc γ RIIA содержит в своем цитоплазматическом домене иммунорецепторный активирующий мотив на основе тирозина (ITAM). Ингибирующий рецептор Fc γ RIIB содержит в своем цитоплазматическом домене иммунорецепторный ингибирующий мотив на основе тирозина (ITIM)(см. Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). NK-клетки имеют только Fc γ RIIIA, и связывание антител с Fc γ RIIIA приводит к сообщению этим NK-клеткам ADCC-активности.

У человека были обнаружены аллельные варианты нескольких Fc γ R человека. Было показано, что эти аллельные варианты обнаруживают различия в связывании с IgG человека и мыши, а различные исследования их взаимодействия выявили корреляцию клинических результатов с присутствием специфических аллельных форм (см. публикацию Lehrnbecher et al. *Blood* 94(12):4220-4232 (1999)). В нескольких исследованиях был проведен анализ двух форм Fc γ RIIA, R131 и H131 и была оценена их взаимосвязь с клиническими результатами (Hatta et al., *Genes and Immunity* 1:53-60 (1999); Yap et al. *Lupus* 8:305-310 (1999) and Lorenz et al. *European J. Immunogenetics* 22:397-401 (1995)). В настоящее время было проведено исследование только двух аллельных форм Fc γ RIIIA, F158 и V158 (Lehrnbecher et al. см. выше; и Wu et al., *J. Clin. Invest.* 100(5):1059-1070 (1997)). Аллотип Fc γ RIIIA (Val158) взаимодействует с IgG человека лучше, чем аллотип Fc γ RIIIA (Phe158)(Shields et al., *J. Biol. Chem.* 276:6951-6604 (2001); Koene et al. *Blood* 90:1109-1114 (1997) and Wu et al., *J. Clin. Invest.* 100:1059-1070 (1997)).

Сайт связывания с Fc γ R у антител человека и мыши был ранее картирован по так называемой “нижней шарнирной области”, состоящей из остатков 233-239 (пронумерованных в соответствии с Европейской системой нумерации по Кэбату и др., как описано в публикации Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Woof et al. *Molec. Immunol.* 23:319-330 (1986); Duncan et al., *Nature* 332:563 (1988); Canfield & Morrison, *J. Exp. Med.* 173:1483-1491 (1991); Chappel et al. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88: 9036-9040 (1991). Из остатков 233-239 остатки P238 и S239 рассматриваются как

остатки, которые, возможно, участвуют в связывании.

Другими рассматриваемыми ранее областями, которые могут связываться с FcγR, являются: G316-K338 (IgG человека) для FcγRI человека (оценка была проведена только путем сравнения последовательностей, при этом мутанты с заменами не анализировались)(Woof et al., *Molec. Immunol.* 23:319-330 (1986)); K274-R301 (IgG1 человека) для FcγRIII человека (пептидный анализ)(Sarmay et al. *Molec. Immunol.* 21:43-51 (1984)); Y407-R416 (IgG человека) для FcγRIII человека (пептидный анализ)(Gergely et al. *Biochem. Soc. Trans.* 12:739-743 (1984)), а также N297 и E318 (IgG2b мыши) для FcγRII мыши (Lund et al., *Molec. Immunol.* 29:53-59 (1992)). См. также Armour et al. *Eur. J. Immunol.* 29:2613-2624 (1999).

В патенте США № 6737056, Presta были описаны полипептидные варианты, обладающие повышенной или пониженной способностью связываться с FcR. См. также Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001). Варианты Fc, связывающиеся с FcγR, также описаны в WO 2004/063351.

C1q и две сериновые протеазы, C1q и C1s, образуют комплекс C1, т.е. первый компонент пути комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC). C1q представляет собой шестивалентную молекулу с молекулярной массой приблизительно 460000 Дальтон и имеет структуру, напоминающую “букет тюльпанов”, в которой шесть коллагеновых “стеблей” соединены с шестью верхними глобулярными областями. См. Burton & Woof, *Advances in Immunol.* 51:1-84 (1992). Для инициации каскада реакций активации комплемента необходимо, чтобы молекула C1q связывалась по меньшей мере с двумя молекулами из IgG1, IgG2 или IgG3 (существует мнение, что IgG4 не активирует комплемент), и только с одной молекулой IgM, агрегированной с антигеном-мишенью. См. публикацию Ward & Ghetie, *Therapeutic Immunology* 2:77-94 (1995), стр. 80.

Исходя из результатов анализа химических модификаций и кристаллографических исследований (Burton et al. *Nature*, 288:338-344 (1980), было высказано предположение, что сайт связывания с субкомпонентом C1q комплемента на IgG охватывает последние две (С-концевые) β-цепи домена СН2. Позже, Бэтон (*Molec. Immunol.* 22(3):161-206 (1985)) высказал предположение, что область, содержащая аминокислотные остатки 318-337, может участвовать в связывании комплемента.

В публикации Duncan & Winter, *Nature* 332:738-40 (1988), где описан метод с применением сайт-направленного мутагенеза, сообщалось, что остатки Glu318, Lys320 и Lys322 образуют сайт связывания с C1q. Данные, представленные Duncan и Winter, были получены путем анализа на связывание изотипа IgG2a мыши с C1q морской свинки. Роль остатков Glu318, Lys320 и Lys322 в связывании с C1q подтверждалась способностью короткого синтетического пептида, содержащего эти остатки, ингибировать комплемент-опосредуемый лизис. Аналогичные результаты приводятся в патенте США № 5648260, выданном 15 июля 1997, и в патенте США № 5624821, выданном 29 апреля 1997.

Остаток Pro331 участвует в связывании с C1q, что подтверждал анализ на способность IgG человека нескольких подклассов осуществлять комплемент-опосредуемый лизис клеток. Замена остатка Ser331 остатком Pro331 в IgG4 сообщала им способность к активации комплемента (Tao et al., *J. Exp. Med.*, 178:661-667 (1993); Brekke et al., *Eur. J. Immunol.*, 24:2542-47 (1994)).

Исходя из сравнения данных, полученных группой специалистов, Winter и др., и данных представленных в работах Tao и др. и Brekke и др., Ward и Ghetie в своих обзорных статьях сделали вывод, что существуют по меньшей мере две другие

области, участвующие в связывании с C1q, а именно одна область, присутствующая на β -цепи домена CH2, имеющего остатки Glu318, Lys320 и Lys322, и другая область, присутствующая на спирали, расположенной в непосредственной близости от той же самой β -цепи и содержащей ключевую аминокислотный остаток в положении 331.

В других работах было высказано предположение, что остатки Lys235 и Gly237 IgG1 человека, локализованные в нижней шарнирной области, играют ключевую роль в связывании и активации комплемента. См. Xu et al. *J. Immunol.* 150:152A (Реферат) (1993). В заявке WO94/29351, опубликованной 22 декабря, 1994, сообщалось, что аминокислотные остатки, необходимые для связывания IgG1 человека с C1q и FcR, расположены в N-концевой области домена CH2, т.е., остатки 231-238.

Кроме того, было высказано предположение о том, что способность IgG связываться с C1q и активировать каскад комплемента также зависит от присутствия, отсутствия или модификации углеводной части, расположенной между двумя доменами CH2 (которые обычно заякорены в положении Asn297). См. публикацию Ward & Ghetie, *Therapeutic Immunology* 2:77-94 (1995), стр.81.

Полипептидные варианты, имеющие модифицированные аминокислотные последовательности в Fc-области и обладающие повышенной или пониженной способностью связываться с C1q, описаны в патенте США № 6194551B1 и в заявке WO99/51642. Содержание этих патентных публикаций во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки. См. также публикацию Idusogie et al. *J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000).

Другим типом Fc-рецептора является Fc-рецептор новорожденных (FcRn). По своей структуре, FcRn аналогичен главному комплексу гистосовместимости (МНС) и состоит из α -цепи, нековалентно связанной с β 2-микроглобулином. Многие функции Fc-рецептора новорожденных, FcRn, описаны в публикации Ghetie & Ward (2000) *Annu. Rev. Immunol.* 18, 739-766. FcRn играет ключевую роль в гомеостазе IgG, основанном на рН-зависимом взаимодействии с Fc-областью антитела (Ghetie & Ward (2000) *Annu. Rev. Immunol.* 18, 739-766; Ghetie & Ward (1997) *Immunol. Today* 18, 592-598). Было обнаружено, что повышение аффинности комплекса Fc-FcRn при рН 6 и сохранение низкой аффинности при рН 7,4 приводит к увеличению времени полужизни антитела (Hinton et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 6213-6216). FcRn играет определенную роль в пассивном переносе иммуноглобулинов IgG от матери к ребенку и в регуляции уровней IgG в сыворотке. FcRn действует как рецептор "спасения", связывается с подвергнутыми пиноцитозу IgG и переносит их в интактной форме вовнутрь клеток и во внеклеточное пространство, и тем самым предотвращает вступление этих IgG на путь гидролитического расщепления, как показано на фиг.б. Хотя механизмы, ответственные за "спасение" IgG, пока еще точно не известны, однако, считается, что несвязанные IgG имеют прямую тенденцию к протеолизу в лизосомах, тогда как связанные IgG проходят повторный цикл на клеточных поверхностях и высвобождаются. Такая регуляция происходит в эндотелиальных клетках, имеющих во всех тканях взрослых людей. FcRn экспрессируются по меньшей мере в печени, в молочной железе и в тонком кишечнике взрослого человека.

FcRn связывается с IgG, однако, при тщательном исследовании взаимодействия FcRn с IgG было обнаружено, что в таком взаимодействии участвуют остатки, присутствующие в доменах CH2 и CH3, граничащих с Fc-областью IgG. Эти остатки взаимодействуют с остатками, локализованными, главным образом, в α 2-домене FcRn.

В публикации Ghetie et al., *Nature Biotechnology* 15:637-640 (1997) описан неспецифический мутагенез остатков Thr252, Thr254 и Thr256 в Fc γ 1 мыши, т.е.

остатков, расположенных в непосредственной близости от сайта взаимодействия FcRn-IgG, который был проведен для исследования влияния этих мутаций на время полужизни вариантов фрагментов “шарнирная область-Fc” в сыворотке. Мутант с самой высокой аффинностью связывания с FcRn мыши имеет более длительное время полужизни в сыворотке, чем фрагмент дикого типа, несмотря на его меньшую скорость диссоциации из FcRn при pH 7,4.

В проведенных ранее исследованиях, Presta и его сотрудниками был осуществлен крупномасштабный аланин-сканирующий мутагенез (Shields et al., J. Biol. Chem. 276: 6591-6604 (2001); Presta, патент США № 6737056), в результате которого были идентифицированы три Fc-варианта, N434A, E380A и T307A, которые имели повышенную аффинность Fc:FcRn в 3,5 раз, в 2,2 раза и в 1,8 раз, соответственно. Мутант с тремя заменами имел аффинность по отношению к FcRn при pH 6, которая в 12 раз превышала аффинность антитела дикого типа.

С учетом структурной гомологии между Fc:FcRn человека и Fc-FcRn крысы, которая была оценена с помощью рентгеноструктурного анализа (Burnmeister et al., Nature 372:336-343 (1994); Burnmeister et al., Nature 372:379-383 (1994)), Dall'Acqua et al. (Journal of immunology, 169, 5171-5180 (2002); US2003/0190311), были предприняты попытки дальнейшего повышения уровня аффинности посредством фагового представления. Авторами этих публикаций были сконструированы четыре рандомизированных библиотеки Fc, каждая из которых имела 4 или 5 полностью рандомизированных остатков (т.е. она имела все возможные аминокислотные замены, и в результате было создано две библиотеки с вариабельностью 20^4 и две библиотеки с вариабельностью 20^5) и проводили отбор на связывание с FcRn мыши. При этом сообщалось, что попытки использования FcRn человека для скрининга этих библиотек оказались безуспешными. Хотя повышение аффинности связывания, идентифицированное с помощью фагового отбора с использованием FcRn мыши, также приводило к повышению аффинности связывания с FcRn человека, однако, как сообщалось, прямой фаговый отбор с использованием FcRn человека, проводимый описанными методами, оказался безуспешным (Dall'Acqua et al., 2002). С использованием этих библиотек были идентифицированы варианты с мутациями в положениях H433, N434 и Y436, и в положениях M252, S254 и T256. Было обнаружено, что два из этих вариантов, происходящих от данной библиотеки, а именно, H433K+N434F+Y436H и M252Y+S254T+T256E, обладают в 10-20-раз более высокой аффинностью связывания с FcRn мыши и человека при pH 6,0. Комбинация этих мутаций приводит к 30-кратному увеличению аффинности связывания с FcRn мыши и к 57-кратному увеличению аффинности связывания с FcRn человека. Однако эти варианты также обладают повышенной аффинностью при pH 7,4 и не имеют продолжительного времени полужизни у мышей. Эти результаты подтвердили мнение, что эффективный метаболический цикл IgG связан с pH-зависимой аффинностью. Также отсутствуют какие-либо данные относительно этих вариантов у приматов или у животных, трансгенных по FcRn человека.

В патентах США № 6277375, 6821505 и 6165745, Ward и сотрудниками были описаны иммуноглобулин-подобные домены, имеющие повышенное время полужизни в сыворотке и содержащие мутации в области Fc в положении 434. Полученный мутант N434Q обнаруживал, фактически, уменьшенное время полужизни. В заявке WO 98/23289, Israel и Simister, в общих чертах, обсуждается модификация остатка 434 путем добавления, замены или делеции этого остатка, осуществляемых для оценки влияния такой модификации на связывание, однако, в этой заявке нет каких-либо упоминаний

о том, что этот остаток должен быть заменен или добавлен.

Кроме того, с учетом структурной гомологии между комплексом “Fc-FcRn крысы” (Burnmeister et al., 1997) и моделью пограничной области Fc-FcRn человека, Хинтон и др. (J.Biol.Chem. 279:6213-6216 (2004)) идентифицировали остатки T250, L314 и M428 в IgG2a человека как остатки, которые могут играть важную роль в связывании с huFcRn. Ими также были идентифицированы мутации T250Q и M428L, которые приблизительно в 3-7 раз повышают аффинность связывания, соответственно, с FcRn человека при pH 6,0, и не оказывают какого-либо значимого влияния на связывание при pH 7,5. Сообщалось, что комбинированный вариант T250Q + M428L имеет в 28 раз большую аффинность связывания. Аналогичный уровень связывания наблюдался для FcRn макак-резусов. Фармакокинетические анализы показали, что у макак-резусов, антитело IgG2, содержащее эти две мутации, имеет в 1,9 раз большее время полувыведения ($t=1/2\beta$) из организма.

В настоящее время, получение антител, а в частности, терапевтических антител, обладающих улучшенной или модулированной эффекторной функцией, все еще остается актуальным. Одной из целей конструирования таких антител является увеличение времени полужизни указанных антител *in vivo*. Это может быть достигнуто путем модуляции взаимодействия такого антитела с Fc-рецептором новорожденных (FcRn). Настоящее изобретение удовлетворяет этим и другим требованиям.

Описание сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к полипептидам, а в частности, к антителам, обладающим более высокой аффинностью связывания с FcRn и Fc γ RIII, чем полипептиды, имеющие Fc-область с нативной последовательностью/последовательностью дикого типа. Эти полипептиды и антитела, содержащие вариант Fc-области, имеют то преимущество, что они не разлагаются, а вместо этого сохраняются и поступают на повторный метаболический цикл. Увеличение времени полужизни в сыворотке может способствовать повышению времени воздействия антитела и снижению частоты введения Fc-содержащих полипептидов, таких как Ab и других антителосодержащих гибридных белков, таких как иммуноадгезины.

Настоящее изобретение относится к выделенному полипептиду, содержащему вариант Fc-области IgG, содержащий по меньшей мере одну замену аминокислоты Asn434 на Trp (N434W).

Вторым выделенным полипептидом является полипептид, содержащий вариант Fc-области IgG, содержащий по меньшей мере одну замену аминокислоты Asn434 на His (N434H).

Другим выделенным полипептидом согласно изобретению является полипептид, содержащий вариант Fc-области IgG, содержащий по меньшей мере одну замену аминокислоты Asn434 на Tyr (N434Y), где указанный полипептид не имеет других аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из N433R, N433S, Y436H, Y436R, Y436T.

Еще одним полипептидом является выделенный полипептид, содержащий вариант Fc-области IgG, содержащий по меньшей мере одну замену аминокислоты Asn434 на Phe (N434F), где указанный полипептид не имеет других аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из N433K, Y436H, M252Y, S254T или T256E.

Настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему вариант Fc-области IgG, где указанный вариант Fc-области IgG имеет аминокислотную замену, включающую, по существу, замену Asn434 на Tyr (N434Y), или состоящую из такой замены. Настоящее изобретение также относится к полипептиду, содержащему вариант Fc-области IgG, где указанный вариант Fc-области IgG имеет аминокислотную замену, включающую, по существу, замену Asn434 на Phe (N434F), или состоящую из такой замены.

В одном из вариантов изобретения, выделенным полипептидом в соответствии с любым из предыдущих вариантов является антитело. В другом варианте изобретения, указанным полипептидом является иммуноадгезин.

В предпочтительных вариантах изобретения, антитело IgG в соответствии с любым из предыдущих вариантов изобретения является антителом мыши или человека, а предпочтительно, человека. IgG человека охватывает IgG человека любого изотипа, а именно, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. IgG мыши охватывает изотипы IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3. Предпочтительными терапевтическими антителами, применяемыми для лечения человека, являются гуманизованные, антитела человека или химерные антитела.

В ранее описанных полипептидах, которыми являются антитела, полипептид, содержащий вариант Fc-области, связывается с FcRn человека при pH 6,0 с более высокой аффинностью, чем полипептид, содержащий IgG с Fc-областью, имеющей нативную последовательность, и связывается с FcRn человека с меньшей аффинностью связывания при pH 7,4 или при pH 7,5, чем при pH 6,0. В предпочтительном варианте изобретения, аффинность связывания варианта полипептида Fc с FcRn при pH 6,0 по меньшей мере в 4 раза, предпочтительно по меньшей мере в 7 раз, в 9 раз, еще более предпочтительно по меньшей мере в 20 раз превышает аффинность связывания нативной последовательности/природной последовательности Fc. Полипептиды в соответствии с предыдущими вариантами изобретения имеют более длительное время полужизни в сыворотке у приматов, а в частности, в сыворотке человека или собакоподобных обезьян, чем время полужизни полипептида, имеющего Fc-область с нативной последовательностью.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к выделенному полипептиду, содержащему вариант Fc-области IgG, содержащий по меньшей мере замену аминокислоты Lys334 на лейцин (K334L). В одном из вариантов изобретения, этот полипептид связывается с FcγRIII человека с более высокой аффинностью, а именно, с аффинностью, которая более чем в 3 раза превышает аффинность полипептида, имеющего Fc-область IgG с нативной последовательностью. Этот полипептид также, предпочтительно, обладает более высокой ADCC по сравнению с полипептидом, имеющим Fc-область IgG с нативной последовательностью.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полипептиду, содержащему вариант Fc-области IgG, который обладает повышенной аффинностью связывания с FcRn человека при pH 6, но не обладает повышенной аффинностью связывания при pH 7,4, и который содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену G385H, D312H или N315H.

В одном из вариантов изобретения, выделенным полипептидом в соответствии с любым из предыдущих вариантов является антитело. В другом варианте изобретения, указанным полипептидом является иммуноадгезин.

В предпочтительных вариантах изобретения антитело IgG в соответствии с любым из предыдущих вариантов изобретения является антителом мыши или человека, а

предпочтительно, человека. IgG человека охватывает IgG человека любого изотипа, а именно, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. IgG мыши охватывает изотипы IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3. Предпочтительными терапевтическими антителами, применяемыми для лечения человека, являются гуманизованные, человеческие или химерные антитела.

5 В частности, настоящее изобретение относится к антителам в соответствии с предыдущими вариантами изобретения, которые связываются с группой антигенов, состоящей из CD20, Her2, BR3, TNF, VEGF, IgE, CD11a. В конкретных вариантах изобретения, рекомбинантно продуцированные гуманизованные антитела, которые
10 связываются с конкретными антигенами, содержат последовательности, представленные в SEQ ID NO и описанные в нижеследующем разделе, озаглавленном “Композиции антител”.

В предпочтительном варианте изобретения указанным CD20 является CD20 приматов. Конкретными вариантами CD20 являются CD20 человека и
15 собакоподобных обезьян. В более конкретных вариантах изобретения, если указанное антитело связывается с CD20 человека, то такое антитело будет содержать последовательность VH SEQ ID NO:2 и L-цепь, содержащую последовательность VL SEQ ID NO:1, или полноразмерную последовательность L-цепи SEQ ID NO:26. В
20 другом варианте изобретения CD20-связывающее антитело содержит последовательность VL C2B8, происходящую от SEQ ID NO:24, и последовательность VH, происходящую от SEQ ID NO:25, как показано на фиг.10. В других вариантах изобретения, выделенное гуманизованное антитело, связывающееся с CD20 человека, содержит последовательности VH и VL, описанные ниже в разделе
25 “Гуманизованные варианты 2H7”.

В более конкретных вариантах изобретения, если указанное антитело связывается с HER2, то такое антитело содержит последовательности V_L и V_H , выбранные из последовательности V_L SEQ ID NO:3, связанной с последовательностью V_H SEQ ID NO:
30 4; и последовательности V_L SEQ ID NO:5, связанной с последовательностью V_H SEQ ID NO:6. Одно из специфических антител против HER2 содержит вариант Fc-области IgG, содержащий по меньшей мере одну аминокислотную замену Asn434 на His (N434H).

Кроме того, настоящее изобретение относится к выделенному анти-HER2 антителу,
35 содержащему последовательность V_L SEQ ID NO:5, последовательность V_H SEQ ID NO:6 и вариант Fc-области IgG, содержащий по меньшей мере одну аминокислотную замену Asn434 на Ala (N434A).

В предпочтительных вариантах изобретения, последовательности VH и VL согласно изобретению присоединены к константной области IgG1 человека,
40 последовательность которой представлена на фиг.4 и на фиг.5.

В одном из аспектов изобретения антитела в соответствии с предыдущими вариантами изобретения дополнительно содержат одну или несколько аминокислотных замен в Fc-области, которые сообщают указанному антителу, по
45 сравнению с антителом, имеющим Fc-область с нативной последовательностью, одно или несколько свойств, выбранных из таких свойств, как повышенный уровень связывания с FcγR; повышенная ADCC; повышенная CDC; пониженная CDC; повышенная ADCC и CDC; повышенная ADCC, но пониженная CDC-функция; повышенный уровень связывания с FcRn; и более длительное время полужизни в сыворотке.

Антитело в соответствии с предыдущими вариантами изобретения может дополнительно содержать одну или несколько аминокислотных замен в

5 Fc-области IgG в положениях остатков, выбранных из группы, состоящей из D265A, S298A/E333A/K334A, K334L, K322A, K326A, K326W, E380A и E380A/T307A, где указанные остатки пронумерованы в соответствии с Европейской нумерацией по Кэбату. Если указанный полипептид имеет аминокислотную замену K334L, то он может дополнительно иметь одну или несколько аминокислотных замен в Fc-области IgG в положениях остатков, выбранных из группы, состоящей из D265A, S298A/E333A, K322A, K326A, K326W, E380A и E380A/T307A.

10 Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей полипептид или антитело в соответствии с любым из предыдущих вариантов, и носитель, такой как фармацевтически приемлемый носитель.

15 В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид в соответствии с любым одним из предыдущих вариантов. Настоящее изобретение также относится к экспрессионным векторам, кодирующим полипептиды, включая антитела согласно изобретению.

Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид или антитело согласно изобретению.

20 Клетками-хозяевами, экспрессирующими и продуцирующими указанный полипептид, являются клетки CHO или бактериальные клетки *E.coli*. Настоящее изобретение также относится к способу продуцирования полипептидов, антител и иммуноадгезинов согласно изобретению, включающему культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую указанный полипептид, и продуцирующей такой полипептид, и выделение указанного полипептида из клеточной культуры.

25 В еще одном своем аспекте настоящее изобретение относится к промышленному изделию, включающему контейнер и содержащуюся в нем композицию, где указанная композиция содержит полипептид или антитело в соответствии с любым из предыдущих вариантов. Указанное промышленное изделие может дополнительно содержать вкладыш, на котором указано, что указанная композиция может быть использована для лечения заболевания, при котором может быть показано применение указанного антитела.

30 Настоящее изобретение относится к способу лечения В-клеточной опухоли или злокачественного заболевания, характеризующихся экспрессией CD20 В-клетками, где указанный способ включает введение пациенту, страдающему опухолевым или злокачественным заболеванием, терапевтически эффективного количества CD20-связывающего антитела, а в частности, гуманизированного CD20-связывающего антитела в соответствии с вышеописанными вариантами. В конкретных вариантах изобретения В-клеточной опухолью является не-ходжкинская лимфома (НХЛ), мелкоклеточная лимфоцитарная (МЛ) НХЛ, лимфоцитарно-преобладающая болезнь Ходжкина (ЛПБХ), фолликулярные центроцеллюлярные (ФЦК) лимфомы, острый лейкоцитарный лейкоз (ОЛЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) и ретикулоэндотелиоз.

45 В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к способу лечения хронического лимфоцитарного лейкоза, включающему введение пациенту, страдающему таким лейкозом, терапевтически эффективного количества антитела, содержащего вариант Fc-области IgG в соответствии с вышеуказанными вариантами и связывающегося с CD20 человека, где указанное антитело дополнительно имеет аминокислотную замену K326A или K326W.

50 В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу ослабления симптомов В-клеточного регулируемого аутоиммунного заболевания, включающему

введение пациенту, страдающему таким заболеванием, терапевтически эффективного количества CD20-связывающего антитела, содержащего вариант Fc-области IgG в соответствии с вышеуказанными вариантами. В конкретных вариантах изобретения аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из ревматоидного артрита, юношеского ревматоидного артрита, системной красной волчанки (СКВ), болезни Вегенера, воспалительного заболевания кишечника, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (ИТП), тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП), аутоиммунной тромбоцитопении, рассеянного склероза, псориаза, IgA-нефропатии, IgM-полиневропатии, тяжелой миастении, васкулита, сахарного диабета, синдрома Рейно, синдрома Сьегрена и гломерулонефрита.

Настоящее изобретение также относится к другим способам лечения, таким как: способ лечения расстройства, связанного с ангиогенезом, где указанный способ включает введение пациенту, страдающему таким расстройством, терапевтически эффективного количества VEGF-связывающего антитела, содержащего вариант Fc-области IgG в соответствии с описанными выше вариантами;

способ лечения HER2-экспрессирующей раковой опухоли, включающий введение пациенту, страдающему таким раковым заболеванием, терапевтически эффективного количества HER2-связывающего антитела, содержащего вариант Fc-области IgG в соответствии с описанными выше вариантами;

способ лечения LFA-1-опосредуемого расстройства, включающий введение пациенту, страдающему таким расстройством, терапевтически эффективного количества антитела, которое связывается с CD11a человека, и которое содержит вариант Fc-области IgG в соответствии с описанными выше вариантами;

способ лечения IgE-опосредуемого расстройства, включающий введение пациенту, страдающему таким расстройством, терапевтически эффективного количества антитела, связывающегося с IgE человека и содержащего вариант Fc-области IgG в соответствии с описанными выше вариантами.

В еще одном своем аспекте настоящее изобретение относится к способу скрининга полипептида, который обладает более высокой аффинностью связывания с FcRn при pH 6,0 и более низкой аффинностью связывания при pH 7,4. Предпочтительно, полипептид обладает более высокой аффинностью связывания с FcRn человека при pH 6,0, чем полипептид или антитело, имеющие Fc IgG с нативной последовательностью. Указанный способ включает экспрессию полипептида-кандидата на фаге; получение huFcRn, иммобилизованного на твердой матрице; связывание фаговых частиц с указанным FcRn на такой матрице; удаление несвязанных фаговых частиц путем проведения множества раундов промывок в условиях высокой жесткости для каждого раунда; и элюирование оставшегося связанного фага при pH 7,4.

Краткое описание графического материала

На фигуре 1 схематически представлены нативный IgG и его ферментативное расщепление с образованием различных фрагментов антитела. Дисульфидные связи представлены как связи S-S между доменами CH1 и CL и двумя доменами CH2. V означает переменный домен; C означает константный домен; L означает легкую цепь, а H означает тяжелую цепь.

На фигурах 2A и 2B представлены аминокислотные последовательности VL (фиг.2A; SEQ ID NO:5) и VH (фиг.2B; SEQ ID NO:6) анти-Her2 антитела (Трастузумаба).

На фигурах 3A и 3B представлены последовательности легкой и тяжелой цепей специфических анти-IgE антител E25, E26, E27 и Hu-901.

На фигуре 4 проиллюстрировано сопоставление последовательностей Fc-области IgG человека, имеющего нативную последовательность, humIgG1 (не-A и A-аллотипов; SEQ ID NO:29 и 30, соответственно), humIgG2 (SEQ ID NO:31), humIgG3 (SEQ ID NO:32) и humIgG4 (SEQ ID NO:33), где различия между этими последовательностями помечены звездочками.

На фигуре 5 проиллюстрировано сопоставление путем выравнивания Fc-областей IgG, имеющих нативную последовательность. Показаны также нативные последовательности Fc-области IgG человека, humIgG1 (не-A и A-аллотипы)(SEQ ID NO:29 и 30, соответственно), humIgG2 (SEQ ID NO:31), humIgG3 (SEQ ID NO:32) и humIgG4 (SEQ ID NO:33). Последовательность IgG1 человека не является A-аллотипом, и различия между этой последовательностью и последовательностью A-аллотипа (в положениях 356 и 358; Европейская система нумерации) показаны внизу под последовательностью IgG1 человека. Также представлены нативные последовательности Fc-области IgG мыши, murIgG1 (SEQ ID NO:34), murIgG2a (SEQ ID NO:35), murIgG2B (SEQ ID NO:36) и murIgG3 (SEQ ID NO:37).

На фигуре 6 проиллюстрирована роль FcRn в гомеостазе IgG. Овалы внутри везикул означают FcRn.

На фигуре 7 представлена последовательность модифицированного белка Fc IgG1 человека (W0437), используемого для фагового представления. Показана также последовательность зрелого белка (SEQ ID NO:38) растворимого Fc, но часть g3p M13, используемого для фагового представления, не показана. Первый остаток в последовательности зрелого белка, Ser, соответствует мутации второго Cys шарнирной области (C229), а последний остаток (Leu) находится в положении присоединения к g3p M13. Подчеркнутый остаток соответствует положению N434.

На фигуре 8 проиллюстрирован анализ на равновесное связывание продуцируемого в *E.coli* Fc дикого типа и варианта Fc с FcRn человека при pH 6,0, проведенный с помощью SPR (BIAcore).

На фигуре 9 проиллюстрирован ELISA-анализ на связывание вариантов IgG1 2H7 с FcRn человека. Варианты IgG1 человека получали путем временной трансфекции клеток млекопитающих и сравнивали с гуманизованным 4D5 (герцептином®) путем проведения анализа на связывание с FcRn при pH 6,0 или при pH 7,4. Показана также ассоциация (pH 6,0) и диссоциация (pH 7,4) покрытого нейтравидином и ПХ-конъюгированного FcRn-биотинилированного козьего антитела против F(ab')₂ IgG человека.

На фигуре 10 представлены последовательности легкой цепи (SEQ ID NO:24) и тяжелой цепи (SEQ ID NO:25) антитела C2B8. Константные и Fc-области показаны в рамках, а за пределами этих рамок показаны переменные области.

На фигуре 11 проиллюстрирован ELISA-анализ на аффинное связывание вариантов 2H7 с FcγRIII человека (V158).

На фигуре 12 показан график временной зависимости концентрации PRO145234, PRO145181 и PRO145182 в сыворотке после их i.v.-введения собакоподобным обезьянам в виде разовой дозы, составляющей 20 мг/кг.

На фигуре 13 проиллюстрировано связывание герцептина и hu4D5(N434H) с FcRn человека при pH 6,0 и при pH 7,4, проанализированное с помощью ELISA.

Подробное описание предпочтительных вариантов изобретения

Важным компонентом гомеостаза IgG является метаболический цикл, опосредуемый pH-зависимым взаимодействием Fc-области с неонатальным рецептором клеточной поверхности, FcRn. Главной целью при конструировании

антител является идентификация мутаций в Fc, повышающих аффинность комплекса Fc-FcRn при pH 6,0, с сохранением низкой аффинности при pH 7,4 (Ghetie et al., 1997). Кроме того, было бы крайне желательно минимизировать число мутаций, вводимых в Fc, во избежание возможного продуцирования иммунных ответов в виде 5 выработки антител против лекарственных средств у пациентов, подвергаемых лечению терапевтическими антителами, имеющими мутации в высококонсервативных константных доменах. Авторы настоящего изобретения идентифицировали одиночные аминокислотные мутации (N434W, N434Y и N434F; в настоящей заявке, 10 для Fc-области IgG применяется Европейская система нумерации, описанная Кэбатом (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (1991)), повышающие аффинность связывания Fc с FcRn человека, где указанный N434W-мутант имеет примерно в 170 раз более высокую аффинность связывания с Fc, при pH 6,0, и сохраняет низкую аффинность связывания с huFcRn при pH 7,4, при этом авторами 15 настоящего изобретения был применен метод фагового представления и новый способ конструирования библиотек рандомизированных аминокислот.

Методы определения уровня связывания с FcRn известны специалистам (см. например, Ghetie, 1997, Hinton, 2004) и описаны в примерах. Уровень связывания с FcRn 20 человека *in vivo* и время полужизни в сыворотке полипептидов, обладающих высокой аффинностью связывания с FcRn человека, могут быть проанализированы, например, в клеточных линиях трансгенных мышей или в трансфицированных клеточных линиях человека, экспрессирующих FcRn человека, или у приматов, которым вводили варианты полипептидов Fc. В отдельных вариантах изобретения 25 указанный полипептид, а в частности, антитело согласно изобретению, имеющее вариант Fc-области IgG, обладает аффинностью связывания с FcRn человека, превышающей аффинность связывания с полипептидом, имеющим Fc IgG дикого типа по меньшей мере в 7 раз по меньшей мере в 9 раз, более предпочтительно по меньшей 30 мере в 20 раз, еще более предпочтительно по меньшей мере в 40 раз, а наиболее предпочтительно по меньшей мере в 70-100 раз. В конкретном варианте изобретения, аффинность связывания с FcRn человека приблизительно в 70 раз превышает аффинность дикого типа.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полипептиду, 35 содержащему вариант Fc-области IgG, содержащий по меньшей мере одну аминокислотную замену Lys334 на лейцин (K334L). Этот полипептид связывается с Fc γ RIII человека с более высокой аффинностью, которая более чем в 3 раза превышает аффинность Fc IgG с нативной последовательностью. Эти полипептиды, по 40 сравнению с полипептидами Fc IgG, имеющими нативную последовательность, предпочтительно, обладают повышенной ADCC в присутствии эффекторных клеток человека. Если указанным антителом является CD20-связывающее антитело, то ADCC-активность может быть протестирована у трансгенных мышей, экспрессирующих CD20 человека + CD16 (hCD20+/hCD16+Tg-мышей). Анализы 45 на ADCC описаны, например, Presta, в патенте США № 6737056.

В одном из вариантов изобретения для аффинного связывания с FcRn, EC50 или вероятное значение Kd (при pH 6,0) указанного полипептида составляет ≤ 100 нМ, а более предпочтительно, ≤ 10 нМ. В одном из вариантов изобретения для повышенного 50 аффинного связывания с Fc γ RIII (F158; т.е. низкоаффинный изотип), EC50 или вероятное значение Kd составляет ≤ 10 нМ, а для аффинного связывания с Fc γ RIII (V158; высокоаффинный), EC50 или вероятное значение Kd составляет ≤ 3 нМ.

В описании изобретения и в формуле изобретения, нумерация остатков в тяжелой

цепи иммуноглобулина соответствует Европейской системе нумерации, описанной Кэбатом, как описано в публикации Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), точное описание которой вводится в настоящую заявку посредством ссылки. Термин “EU-нумерация по Кэбату” означает Европейскую систему нумерации остатков антитела IgG1 человека.

Термин “родительский полипептид” означает полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, в которой отсутствуют одна или несколько вариантов в Fc-области и которая обладает другой эффекторной функцией, отличающейся от эффекторной функции описанного здесь полипептидного варианта. Такой родительский полипептид может содержать Fc-область с нативной последовательностью или Fc-область с ранее присутствующими модификациями аминокислотной последовательности (такими как добавления, делеции и/или замены).

Термин “Fc-область” используется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, например, как показано на фиг.1. Такая “Fc-область” может представлять собой Fc-область с нативной последовательностью или вариант Fc-области. Хотя, границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьироваться, однако, Fc-область тяжелой цепи IgG человека обычно определяют как фрагмент, начинающийся от аминокислотного остатка в положении Cys226 или от остатка Pro230, и простирающийся до ее карбокси-конца. Fc-область иммуноглобулина обычно содержит два константных домена, CH2 и CH3, как показано, например, на фиг.1. Последний остаток, лизин, в тяжелой цепи IgG1 может, но необязательно, присутствовать как концевой остаток в Fc зрелого белка.

“Домен CH2” Fc-области IgG человека (также обозначаемый доменом “Cγ2”) обычно простирается примерно от аминокислоты 231 до аминокислоты 340. Уникальность домена CH2 состоит в том, что он не имеет непосредственной связи с другим доменом. Если сказать точнее, то две N-связанных разветвленных углеводных цепи располагаются между двумя доменами CH2 интактной молекулы нативного IgG. Было высказано предположение, что такой углевод может служить заменой паре “домен-домен” и может способствовать стабилизации домена CH2. См. Burton, Molec. Immunol. 22:161-206 (1985).

“Домен CH3” содержит фрагмент из остатков, простирающийся от C-конца до домена CH2 в Fc-области (т.е. он простирается приблизительно от аминокислотного остатка 341 до аминокислотного остатка 447 IgG).

“Функциональная Fc-область” обладает “эффекторной функцией” Fc-области с нативной последовательностью. Примерами “эффекторных функций” являются: связывание с C1q; комплемент-зависимая цитотоксичность; связывание с Fc-рецептором; антитело-зависимая клеточно-опосредуемая цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; негативная регуляция рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора; BCR) и т.п. Для обеспечения таких эффекторных функций, обычно требуется, чтобы Fc-область была объединена со связывающим доменом (например, с варибельным доменом антитела), и такие эффекторные функции могут быть проанализированы, например, различными описанными здесь методами.

“Fc-область с нативной последовательностью” содержит аминокислотную последовательность, идентичную природной аминокислотной последовательности Fc-области. Fc-области человека с нативной последовательностью представлены на фигурах 4 и 5 и включают Fc-область IgG1 человека с нативной последовательностью (не-A и A-аллотипы); Fc-область IgG2 человека с нативной последовательностью;

Fc-область IgG3 человека с нативной последовательностью и Fc-область IgG4 человека с нативной последовательностью, а также их природные варианты. Fc-области мыши с нативной последовательностью представлены на фиг.5.

“Вариант Fc-области” содержит аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности нативной Fc-области благодаря введению в эту область по меньшей мере одной “аминокислотной модификации”. Предпочтительно, чтобы такой вариант Fc-области, в отличие от Fc-области с нативной последовательностью или Fc-области родительского полипептида, имел по меньшей мере одну аминокислотную замену, например, примерно от одной до десяти аминокислотных замен, а предпочтительно, примерно от одной до пяти аминокислотных замен. Вариант Fc-области предпочтительно должен быть по меньшей мере примерно на 80%, более предпочтительно по меньшей мере примерно на 90%, а наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно на 95% гомологичен Fc-области с нативной последовательностью и/или с Fc-областью родительского полипептида.

Термин “гомология” определен как процент остатков в модифицированной аминокислотной последовательности, которые являются идентичными после выравнивания последовательностей и введения пробелов, если это необходимо для достижения максимального процента гомологии. Методы и компьютерные программы для такого выравнивания хорошо известны специалистам. Одной из таких компьютерных программ является программа “Align 2”, разработанная фирмой Genentech Inc. и зарегистрированная в пользовательской документации в Ведомстве по копирайту США, United States Copyright Office, Washington, DC 20559, 10 декабря, 1991.

Термин “полипептид, содержащий Fc-область” означает полипептид, такой как антитело или иммуноадгезин (см. нижеследующие определения), содержащие Fc-область.

Используемые здесь термины “Fc-рецептор” или “FcR” означают рецептор, который связывается с Fc-областью антитела IgG. Предпочтительным FcR является FcR человека с нативной последовательностью. В одном из вариантов изобретения, термин “FcR” означает рецептор FcR, который охватывает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов. Рецепторы FcγRII включают FcγRIIA (“активирующий рецептор”) и FcγRIIB (“ингибирующий рецептор”), которые имеют аналогичные аминокислотные последовательности, отличающиеся, главным образом, в их цитоплазматических доменах. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит в своем цитоплазматическом домене иммунорецепторный активирующий мотив на основе тирозина (ITAM). Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит в своем цитоплазматическом домене иммунорецепторный ингибирующий мотив на основе тирозина (ITIM) (см. публикацию M. Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Этот термин включает аллотипы, такие как аллотипы FcγRIIA: FcγRIIA-Phe158, FcγRIIA-Val158, FcγRIIA-R131 и/или FcγRIIA-H131. FcR описаны в публикациях Ravetch & Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994) и de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Используемый здесь термин “FcR” также охватывает и другие FcR, включая FcR, которые будут идентифицированы в будущем. Этот термин также включает неонатальный рецептор FcRn, ответственный за передачу материнских IgG плоду (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) and Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

“Антитело-зависимая клеточно-опосредуемая цитотоксичность” или “ADCC” означает форму цитотоксичности, при которой секретированный Ig, связанный с Fc-рецепторами (FcR), присутствующими на некоторых цитотоксических клетках (например, природных клетках-киллерах (NK), нейтрофилах и макрофагах), сообщает этим цитотоксическим эффекторным клеткам способность специфически связываться с антиген-содержащими клетками-мишенями, и, тем самым, уничтожать клетки-мишени, содержащие цитотоксины. Такие антитела “нейтрализуют” цитотоксические клетки и крайне необходимы для их уничтожения. Первичные клетки, опосредующие ADCC, а именно, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гемопоэтических клетках систематизирована в таблице 3 на стр.464 публикации Ravetch & Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991). Для оценки ADCC-активности представляющей интерес молекулы может быть проведен анализ на ADCC *in vitro*, такой как анализ, описанный в патентах США №№ 5500362 или 5821337. Эффекторными клетками, подходящими для таких анализов, являются мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и природные клетки-киллеры (NK). Альтернативно или дополнительно, ADCC-активность представляющей интерес молекулы может быть оценена *in vivo*, например, у животного-модели, такого как животное, описанное в публикации Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998).

“Эффекторными клетками человека” являются лейкоциты, экспрессирующие один или несколько FcR, и обладающие эффекторными функциями. Предпочтительно, указанные клетки экспрессируют по меньшей мере FcγRIII и обладают эффекторной ADCC-функцией. Примерами лейкоцитов человека, опосредующих ADCC, являются мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), природные клетки-киллеры (NK), моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы, при этом предпочтительными являются МКПК и NK-клетки. Эффекторные клетки могут быть выделены из их природного источника, например, из описанных здесь клеток крови или МКПК.

“Комплемент-зависимая цитотоксичность” или “CDC” означает лизис клеток-мишеней в присутствии комплемента. Активация классического пути комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с антителами (соответствующего подкласса), которые связываются с их когнатным антигеном. Для оценки активации комплемента может быть проведен анализ на CDC, описанный, например, в публикации Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996).

Полипептид, имеющий вариант Fc-области IgG с “измененной” аффинностью связывания с FcR или ADCC-активностью, представляет собой полипептид, обладающий повышенной или пониженной активностью связывания с FcR (FcγR или FcRn) и/или ADCC-активностью по сравнению с активностями родительского полипептида или полипептида, содержащего Fc-область с нативной последовательностью. Fc-вариант, который “обладает повышенной аффинностью связывания” с FcR, связывается по меньшей мере с одним FcR с аффинностью, превышающей аффинность связывания родительского полипептида. Такая аффинность связывания, по сравнению с аффинностью связывания родительского полипептида, может быть увеличена примерно в 3 раза, а предпочтительно, примерно в 5, 10, 25, 50, 60, 100, 150, 200 или в 500 раз, или примерно на 25%-1000%. Полипептидный вариант, который “обладает пониженной аффинностью связывания” с FcR, связывается по меньшей мере с одним FcR с меньшей аффинностью, чем

родительский полипептид. Аффинность связывания, по сравнению с аффинностью связывания родительского полипептида, может быть снижена примерно на 40% или ниже. Такие Fc-варианты, обладающие пониженной аффинностью связывания с FcR, могут иметь незначительную аффинность связывания с FcR, либо они могут иметь почти недетектируемую аффинность связывания с FcR, например, их аффинность связывания с FcR может составлять 0-20% от аффинности Fc-области нативного IgG, например, как определено в нижеследующих примерах.

Полипептид, имеющий вариант Fc-области, который связывается с FcR с “лучшей аффинностью” или с “более высокой аффинностью”, чем аффинность полипептида или родительского полипептида, имеющего IgG Fc с последовательностью дикого типа или с нативной последовательностью, представляет собой полипептид, который связывается с любым одним или несколькими из идентифицированных выше FcR со значительно более высокой аффинностью связывания, чем аффинность связывания родительского полипептида, содержащего нативную Fc, если количество полипептида с вариантом Fc и количество родительского полипептида в анализе на связывание является, в основном, одинаковым. Так, например, вариант полипептида Fc, обладающий повышенной аффинностью связывания с FcR, может обладать примерно в 2-300 раз, например, примерно в 3-170 раз большей аффинностью связывания с FcR по сравнению с аффинностью родительского полипептида, где указанную аффинность связывания с FcR определяют, например, как описано в нижеследующих примерах.

Полипептид, содержащий вариант Fc-области, который “обладает повышенной ADCC” или опосредует антитело-зависимую клеточно-опосредуемую цитотоксичность (ADCC) в присутствии эффекторных клеток человека более эффективно, чем полипептид, имеющий IgG Fc дикого типа, представляет собой полипептид, который обладает *in vitro* или *in vivo* значительно более высокой эффективностью опосредования ADCC, если используемое в анализе количество полипептида, имеющего вариант Fc-области, и количество полипептида, имеющего Fc-область дикого типа, является, по существу, одинаковым. В общих чертах, такие варианты могут быть идентифицированы путем проведения описанного здесь ADCC-анализа *in vitro*, однако, рассматриваются и другие анализы или методы определения ADCC-активности, например, у животного-модели и т.п. Предпочтительным вариантом является вариант, который примерно в 5-100 раз, например, примерно в 25-50 раз более эффективно опосредует ADCC по сравнению с Fc дикого типа.

Термин “аминокислотная модификация” означает изменение в предварительно определенной аминокислотной последовательности. Репрезентативными модификациями являются аминокислотные замены, инсерции и/или делеции. Предпочтительной аминокислотной модификацией, используемой в настоящем изобретении, является замна.

Термин “аминокислотная модификация в конкретном положении”, например, в Fc-области, означает замену или делецию конкретного остатка, или инсерцию по меньшей мере одного аминокислотного остатка, смежного с указанным конкретным остатком. Термин “инсерция смежного конкретного остатка” означает инсерцию в положении одного или двух остатков. Такая инсерция может быть введена со стороны N-конца или со стороны C-конца по отношению к конкретному остатку.

Термин “аминокислотная замена” означает замену по меньшей мере одного аминокислотного остатка, присутствующую в предварительно определенной

аминокислотной последовательности, другим аминокислотным остатком-заместителем. Таким остатком-заместителем или остатками-заместителями могут быть “природные аминокислотные остатки” (т.е. кодируемые генетическим

5 аспарагина (Asn); аспарагиновой кислоты (Asp); цистеина (Cys); глутамина (Gln); глутаминовой кислоты (Glu); глицина (Gly); гистидина (His); изолейцина (Ile); лейцина (Leu); лизина (Lys); метионина (Met); фенилаланина (Phe); пролина (Pro); серина (Ser); треонина (Thr); триптофана (Trp); тирозина (Tyr) и валина (Val). При
10 этом, предпочтительно, чтобы замененный остаток не являлся цистеином. В определении используемого здесь термина “аминокислотная замена” входит также замена одним или несколькими не-природными аминокислотными остатками. Термин “не-природный аминокислотный остаток” означает остаток, не принадлежащий к
15 перечисленным выше природным аминокислотным остаткам, и способный ковалентно связываться со смежным(ми) аминокислотным(ми) остатком(ами) в полипептидной цепи. Примерами не-природных аминокислотных остатков являются норлейцин, орнитин, норвалин, гомосерин и другие аналогичные аминокислотные
20 остатки, такие как остатки, описанные в публикации Ellman et al., Meth. Enzym. 202:301-336 (1991). Для получения таких не-природных аминокислотных остатков могут быть проведены процедуры, описанные Noren et al. Science 244:182 (1989) и Ellman et al., см. выше. Вкратце, эти процедуры включают химическую активацию супрессорной
25 ТРНК с не-природным аминокислотным остатком, и последующей *in vitro* транскрипцией и трансляцией РНК.

Используемый в настоящем изобретении термин “консервативная” аминокислотная замена означает аминокислотные замены функционально эквивалентными
30 аминокислотами. Консервативные аминокислотные замены приводят к образованию “молчащих” мутаций в аминокислотной последовательности полученного пептида. Так, например, одна или несколько аминокислот с одинаковой полярностью
35 действуют как функциональные эквиваленты и образуют “молчащую” альтерацию в аминокислотной последовательности пептида. В общих чертах, замены аминокислот в пределах определенной группы могут рассматриваться как консервативные в отношении их структуры и функции. Однако специалисту в данной области известно,
40 что роль конкретного остатка определяется его окружением в трехмерной структуре молекулы, в которой он присутствует. Так, например, остатки Cys могут присутствовать в окисленной (дисульфидной) форме, которая является менее полярной, чем восстановленная (тиоловая) форма. Длинноцепочечная алифатическая
45 часть боковой цепи остатка Arg может быть решающим фактором в его структурной или функциональной роли, и эта часть может сохранять наибольшую консервативность при замене неполярным остатком, а не каким-либо другим основным остатком. Кроме того, следует отметить, что боковые цепи, содержащие
50 ароматические группы остатков (Trp, Tyr и Phe), могут участвовать в ионо-ароматических или “катионных-π”- взаимодействиях. В этих случаях, замена одной из этих боковых цепей членом кислотной или незаряженной полярной группы, может быть консервативной в отношении их структуры и функции. Остатки, такие как Pro, Gly и Cys (в дисульфидной форме) могут оказывать непосредственное влияние на конформацию главной цепи, и в большинстве случаев, они не могут быть заменены так, чтобы это не приводило к нарушению структуры.

Термин “аминокислотная инсерция” означает введение по меньшей мере одной аминокислоты в предварительно определенную аминокислотную последовательность.

Хотя инсерция обычно включает введение одного или двух аминокислотных остатков, однако, в настоящей заявке также рассматриваются и более крупные “пептидные инсерции”, например, инсерция примерно от трех до пяти или даже примерно до десяти аминокислотных остатков. Введенный(ые) остаток(тки) может(гут) быть

природным(и) или не-природным(и) остатком(ами), как описано выше.
 Термин “аминокислотная делеция” означает удаление по меньшей мере одного аминокислотного остатка из предварительно определенной аминокислотной последовательности.

Аминокислоты могут быть подразделены на группы по общим свойствам их боковых цепей (как описано в публикации A.L. Lehninger, Biochemistry, second ed., pp.73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

- (1) неполярные: Ala(A), Val(V), Ile(I), Pro(P), Phe(F), Trp(W), Met(M);
- (2) незаряженные полярные: Gly(G), Ser(S), Thr(T), Cys(C), Tyr(Y), Asn(N), Gln(Q);
- (3) кислотные: Asp(D), Glu(E);
- (4) основные: Lys(K), Arg(R), His(H).

Альтернативно, природные остатки могут быть подразделены на группы по общим свойствам их боковых цепей:

- (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислотные: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

“Шарнирная область”, по существу, определена как фрагмент, простирающийся от Glu216 до Pro230 IgG1 человека (Burton, Molec. Immunol. 22:161-206 (1985)).

Шарнирные области IgG других изотипов могут быть сопоставлены с последовательностью IgG1 путем введения первого и последнего цистеиновых остатков, образующих межцепевые S-S-связи тяжелой цепи в одних и тех же положениях.

“Нижняя шарнирная область” Fc-области обычно определяется как фрагмент, состоящий из остатков, непосредственно примыкающих к шарнирной области у ее C-конца, т.е., остатков 233-239 Fc-области. В предшествующих работах, способность связываться с FcγR обычно приписывалась аминокислотным остаткам, находящимся в нижней шарнирной области Fc IgG.

“C1q” представляет собой полипептид, включающий сайт связывания с Fc-областью иммуноглобулина. C1q вместе с двумя сериновыми протеазами, C1r и C1s, образует комплекс C1, т.е., является первым компонентом пути комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC). C1q человека может быть закуплен, например, у фирмы Quidel, San Diego, CA.

Термин “связывающий домен” означает область полипептида, связывающегося с другой молекулой. В случае FcR, такой связывающий домен может содержать часть его полипептидной цепи (например, его α-цепи), ответственной за связывание с Fc-областью. Одним из таких подходящих связывающих доменов является внеклеточный домен α-цепи FcR.

Термин “антитело” используется здесь в самом широком смысле, а в частности, охватывает моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они обладают

нужной биологической активностью.

“Функциональные фрагменты” антител согласно изобретению содержат часть интактного антитела, в основном, включая антигенсвязывающую или вариабельную область интактного антитела или Fc-область антитела, которое сохраняет способность связываться с FcR. Примерами фрагментов антител являются линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифические антитела, образованные фрагментами антител.

Используемый здесь термин “моноклональное антитело” означает антитело, происходящее от популяции, по существу, гомогенных антител, т.е., отдельные антитела, входящие в состав такой популяции, являются идентичными, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными и направлены против одного антигенного сайта. Кроме того, в противоположность стандартным препаратам, полученным на основе антител (поликлональных), которые обычно включают различные антитела против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. Моноклональные антитела, помимо их специфичности, обладают преимуществами, заключающимися в том, что они могут быть синтезированы в гибридной культуре, не содержащей примесей в виде других иммуноглобулинов. Термин “моноклональный” относится к типу антитела, происходящего, по существу, от гомогенной популяции антител, и не означает, что такое антитело должно быть получено каким-либо конкретным методом. Так, например, моноклональные антитела, используемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены гибридным методом, впервые описанным Kohler et al., Nature 256:495 (1975), либо они могут быть получены методами рекомбинантных ДНК (см. например, патент США № 4816567). “Моноклональные антитела” могут быть также выделены из фаговых библиотек антител методами, описанными, например, Clackson et al., Nature, 325:624-628 (1991) и Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991).

Используемыми здесь моноклональными антителами, в частности, являются “химерные” антитела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям антител, происходящих от конкретного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу, а остальная(ые) часть(и) идентична(ы) или гомологична(ы) соответствующим последовательностям антител, происходящих от другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу, а также фрагменты таких антител, при условии, что они обладают нужной биологической активностью (патент США № 4816567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81:6851-6855 (1984)). Методы получения химерных антител известны специалистам.

“Гуманизованными” формами не-человеческих (например, мыши) антител являются химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие подпоследовательности антител), содержащие минимальное число последовательностей, происходящих от не-человеческого иммуноглобулина. По большей части, гуманизованными антителами являются иммуноглобулины человека (реципиентное антитело), в которых остатки, происходящие от гипервариабельной области (CDR) реципиента заменены остатками, происходящими от CDR животного, не являющегося человеком (донорного антитела), такого как мышь, крыса или кролик, и обладающими нужной

специфичностью, аффинностью и емкостью. В некоторых случаях, остатки каркасной области (FR) Fv иммуноглобулина человека заменены соответствующими не-человеческими остатками. Кроме того, гуманизованные антитела могут содержать остатки, не присутствующие ни в реципиентном антителе, ни в “импортных” CDR или каркасных последовательностях. Эти модификации вводят для дополнительного улучшения и максимизации эффективности антитела. В общих чертах, гуманизованное антитело содержит, в основном по меньшей мере один, а обычно два переменных домена, в которых все или, в основном, все гипервариабельные петли соответствуют петлям не-человеческого иммуноглобулина, а все или почти все области FR являются областями, имеющими последовательность иммуноглобулина человека, хотя указанные области FR могут включать одну или несколько аминокислотных замен, повышающих аффинность связывания. Число этих аминокислотных замен в FR обычно не превышает 6 в H-цепи и не превышает 3 в L-цепи. В оптимальном случае, гуманизованное антитело также содержит по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно, иммуноглобулина человека. Подробное описание можно найти в публикации Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988) и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992). Термин “гуманизованное антитело” включает приматизированное® антитело, антигенсвязывающая область которого происходит от антитела, продуцируемого, например, в результате иммунизации макака представляющим интерес антигеном. Методы получения гуманизованных антител известны специалистам.

Антитела человека могут быть также получены различными методами, известными специалистам, включая применение библиотек фагового представления. Hoogenboom & Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). Для получения моноклональных антител человека могут быть также применены методы, описанные Cole et al. и Voerner et al. Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p.77 (1985); Voerner et al., *J. Immunol.* 147(1):86-95 (1991).

Используемый здесь термин “иммуноадгезин” означает антитело-подобные молекулы, обладающие специфичностью связывания с гетерологичным белком (“адгезином”) и эффекторными функциями константных доменов иммуноглобулина. По своей структуре, иммуноадгезины представляют собой гибридную аминокислотную последовательность, которая обладает нужной специфичностью связывания, не относящейся к распознаванию антигена, и которая содержит связывающий сайт антитела (т.е., оно является “гетерологичным”) и последовательность константного домена иммуноглобулина. Адгезиновая часть молекулы иммуноадгезина обычно представляет собой смежную аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере сайт связывания с рецептором или лигандом. Последовательность константного домена иммуноглобулина в указанном иммуноадгезине может происходить от любого иммуноглобулина, такого как иммуноглобулины подтипов IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, IgA (включая IgA1 и IgA2), IgE, IgD или IgM. Так, например, подходящими иммуноадгезинами согласно изобретению являются полипептиды, содержащие BLYS-связывающие части рецептора BLYS, в котором отсутствуют трансмембранные или цитоплазматические последовательности. В одном из вариантов изобретения, внеклеточный домен BR3, TAC1 или BCMA присоединен к константному домену последовательности иммуноглобулина.

Термины “гибридный белок” и “гибридный полипептид” означают полипептид, имеющий две части, ковалентно связанные друг с другом, где каждой из этих частей

являются полипептиды с различными свойствами. Таким свойством может быть биологическое свойство, такое как активность *in vitro* или *in vivo*. Указанным свойством может быть обычное химическое или физическое свойство, например, способность связываться с молекулой-мишенью, способность катализировать реакцию и т.п. Эти две части могут быть непосредственно присоединены друг к другу простой пептидной связью или посредством пептидного линкера, содержащего один или несколько аминокислотных остатков. Вообще говоря, эти две части и линкер могут быть связаны между собой с сохранением рамки считывания.

“Выделенными” полипептидами или антителами являются полипептиды или антитела, которые были идентифицированы и отделены от компонента и/или выделены из компонента их природной среды. Примесными компонентами его природной среды являются вещества, негативно влияющие на диагностическое или терапевтическое применение указанного полипептида или антитела, и такими веществами могут быть ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах изобретения, указанное антитело может быть очищено (1) более, чем на 95% по массе антитела, как было определено методом Лаури, а более предпочтительно, более, чем на 99% по массе антитела, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков в N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности, с использованием секвенатора с центрифужной чашкой, или (3) до гомогенности, как может быть определено с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ в восстановительных или в невосстановительных условиях путем окрашивания кумасси синим, или, предпочтительно, серебром. Термин “выделенное антитело” включает антитело *in situ*, присутствующее в рекомбинантных клетках, при условии, что в нем отсутствует по меньшей мере один компонент его природного окружения. Однако, обычно, выделенное антитело может быть получено по меньшей мере в одну стадию очистки.

Биологическая активность CD20-связывающих антител и гуманизованных CD20-связывающих антител согласно изобретению включает по меньшей мере способность указанного антитела связываться с CD20 человека, а более предпочтительно, с CD20 человека и других приматов (включая собакоподобных обезьян, макак-резусов и шимпанзе). Такие антитела связываются с CD20 при величине K_d , не превышающей 1×10^{-8} , а предпочтительно, при величине K_d , не превышающей примерно 1×10^{-9} , и обладают способностью уничтожать или удалять В-клетки *in vivo*, предпочтительно по меньшей мере на 20%, по сравнению с соответствующим негативным контролем, не обработанным таким антителом. Истощение В-клеток может происходить под действием одной или нескольких ADCC, CDC или других механизмов. В некоторых вариантах изобретения, относящихся к лечению заболеваний, для достижения указанных биологических функций, таких как ADCC, может оказаться желательным наличие, помимо прочих, специфических эффекторных функций или механизмов, при этом, некоторые варианты гуманизованного 2H7 являются предпочтительными.

Термины “лечение” или “терапия” или “ослабление симптомов” означают терапевтическое лечение индивидуума, проводимое в целях уменьшения или ослабления симптомов подвергаемого лечению патологического состояния или расстройства. Лечение индивидуума, страдающего CD20-позитивным раковым заболеванием или аутоиммунным заболеванием, считается успешным, если после введения указанному индивидууму терапевтического количества CD20-связывающего антитела согласно изобретению в соответствии со способами настоящего изобретения,

у данного индивидуума наблюдается детектируемое и/или заметное уменьшение или ослабление признаков и симптомов конкретного заболевания, или, если такие признаки и симптомы вообще отсутствуют. Так, например, при лечении рака, такими признаками являются: уменьшение числа раковых клеток или отсутствие раковых
 5 клеток; уменьшение размера опухоли; ингибирование (т.е., уменьшение до некоторой степени, а предпочтительно, уничтожение) метастазов опухоли; ингибирование, до некоторой степени, роста опухоли; увеличение периода ремиссии, и/или ослабление, до некоторой степени, одного или нескольких симптомов, связанных с конкретным
 10 раковым заболеванием; уменьшение заболеваемости и смертности, и улучшение качества жизни. Данный пациент может также ощущать ослабление признаков или симптомов заболевания. Лечение может также приводить к полному выздоровлению пациента, определяемому как исчезновение всех признаков рака, либо оно может давать частичный эффект, при котором размер опухоли снижается, предпочтительно,
 15 более, чем на 50%, а еще более предпочтительно, на 75%. Пациентом, страдающим данным заболеванием, также считается пациент, у которого наблюдается стабильное заболевание. В предпочтительном варианте изобретения, пациентами, страдающими раком, являются пациенты, у которых уже не наблюдается прогрессирование рака через один год, а предпочтительно, через 15 месяцев. Эти параметры оценки
 20 успешного лечения и положительной динамики заболевания могут быть легко установлены рутинными методами, известными врачам-специалистам в данной области.

Термин “терапевтически эффективное количество” означает количество антитела или лекарственного средства, эффективное для “лечения” заболевания или
 25 расстройства у индивидуума. В случае рака, терапевтически эффективное количество указанного лекарственного средства может снижать число раковых клеток; уменьшать размер опухоли; ингибировать (т.е., снижать до определенной степени, а предпочтительно, прекращать) инфильтрацию раковых клеток в периферические
 30 органы; ингибировать (т.е., снижать до определенной степени, а предпочтительно, прекращать) развитие метастазов опухоли; ингибировать, до некоторой степени, рост опухоли, и/или ослаблять, до некоторой степени, один или несколько симптомов, связанных с раком. См. приведенное ранее определение термина “лечение”.
 35 Лекарственное средство, до той степени, в которой оно может предупреждать рост раковых клеток и/или уничтожать имеющиеся раковые клетки, может быть цитостатическим и/или цитотоксическим.

Термин “непрерывное” введение, в отличие от однократного введения, означает
 40 длительное введение указанного(ых) средства(в), так, чтобы начальный терапевтический эффект (активность) поддерживался в течение более длительного периода времени. Термин “периодическое введение” означает введение, которое не проводится в течение длительного периода времени без перерыва, а носит циклический характер.

Используемый здесь термин “цитотоксическое средство” означает вещество, ингибирующее или предотвращающее функцию клеток и/или вызывающее деструкцию
 45 клеток. Этот термин включает радиоактивные изотопы (например, ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P и радиоактивные изотопы Lu), химиотерапевтические
 50 средства, например, метотрексат, адриамицин, винкаалкалоиды (винкристин, винбластин, этопозид), доксорубицин, мелфалан, митомицин С, хлорамбуцил, даунорубицин или другие интеркалирующие агенты, ферменты и их фрагменты, такие как нуклеолитические ферменты, антибиотики и токсины, такие как токсины в виде

небольших молекул, или ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, включая их фрагменты и/или варианты, и различные противоопухолевые или противораковые средства, описанные ниже. Ниже описаны и другие цитотоксические средства.

5 Используемый здесь термин “рост-ингибирующее средство” означает соединение или композицию, ингибирующие рост клеток, а в частности, рост CD20-экспрессирующих раковых клеток, либо *in vitro*, либо *in vivo*. Таким образом, средством, ингибирующим рост клеток, может быть средство, значительно
10 снижающее процент PSCA-экспрессирующих клеток в фазе S. Примерами средств, ингибирующих рост клеток, являются средства, блокирующие прохождение клеточного цикла (в другой фазе, кроме фазы S), такие как средства, индуцирующие блокирование фазы G1 и фазы M. Классическими средствами, блокирующими фазу M, являются винкаалкалоиды (винкристин и винбластин), таксаны и ингибиторы
15 топоизомеразы II, такие как доксорубин, эпирубин, даунорубин, этопозид и блеомицин. Средствами, блокирующими фазу G1, а также блокирующими переход в фазу S, являются, например, ДНК-алкилирующие агенты, такие как тамоксифен, преднизон, дакарбазин, мехлоретамин, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил и ara-C.
20 Дополнительную информацию можно найти в публикации “The Molecular Basis of Cancer”, Mendelsohn & Israel, eds., в главе 1, озаглавленной “Cell cycle regulation, oncogenes and antineoplastic drugs”, Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), а в частности, на стр.13. Таксаны (паклитаксел и доцетаксел) представляют собой противораковые лекарственные средства, изготавливаемые из дерева тиса.
25 Доцетаксел (Таксотер®, Rhone-Poulenc Rorer), изготавливаемый из Европейского тиса, представляет собой полусинтетический аналог паклитаксела (Таксола®, Bristol-Myers Squibb). Паклитаксел и доцетаксел индуцируют сборку микротрубочек из тубулиновых димеров и стабилизируют микротрубочки путем предупреждения деполимеризации,
30 что приводит к ингибированию митоза клеток.

“Химиотерапевтическое средство” представляет собой химическое соединение, используемое для лечения рака. Примерами химиотерапевтических средств являются алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (цитоксан®);
35 алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пиосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилтиофосфорамид и триметилломеламин; азотные аналоги горчичного газа, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид,
40 мехлоретамин, гидрохлорид оксида мехлоретамина, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый аналог горчичного газа; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимнустин; антибиотики, такие как аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабицин,
45 карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубин, деторубин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубин, эпирубин, эзорубин, идарубин, марцелломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пуromoцин, квеламицин, родорубин,
50 стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексан, птероптерин, триметрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин;

пиримидиновые аналоги, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин, 5-FU; андрогены, такие как калустерон, пропионат дромостанолон, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; антиадренергические средства, такие как

5 аминоглутетимид, митотан, трилостан; заменитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамидный гликозид; аминолевулиновая кислота; амсакрин; бестрабуцил; бизантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; этоглуцид; нитрат галлия;

10 гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамнол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбизин; PSK®; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин;

15 арабинозид ("Ara-C"); циклофосфамид; тиотпа; таксоиды, например, паклитаксел (Таксол®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) и доцетаксел (Таксотер®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин;

20 платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин-С; митоксантрон; винкристин; винорелбин, навелбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (ДМФО); ретиноевая кислота; эсперамицины; капецитабин; и фармацевтически приемлемые соли, оксиды или производные всех вышеуказанных соединений. В

25 определение этого термина также входят противогормональные средства, регулирующие или ингибирующие действие гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, 4-(5)-имидазолы, ингибирующие ароматазу, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018,

30 онапристон и торемифен Фарестон®; и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, оксиды или производные любого из вышеупомянутых соединений.

Используемый здесь термин "носители" включает фармацевтически приемлемые

35 носители, наполнители или стабилизаторы, которые являются нетоксичными для клеток или млекопитающих, обработанных указанными носителями в соответствующих дозах и концентрациях. В большинстве случаев, физиологически приемлемым носителем является водный рН-буференный раствор. Примерами физиологически приемлемых носителей являются буферы, такие как фосфат, цитрат и

40 другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; низкомолекулярный (содержащий менее, чем примерно, 10 остатков) полипептид; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин, или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как

45 глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как EDTA; спирты ряда сахаров, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как твин^{ТМ}, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и плуроники^{ТМ}.

50 Термин "млекопитающее" означает любое животное, классифицированное как млекопитающее, включая, человека, домашних и сельскохозяйственных животных, животных, содержащихся в зоопарках, животных, участвующих в спортивных состязаниях или домашних питомцев, таких как собаки, лошади, кошки, коровы и т.п.

Предпочтительным млекопитающим согласно изобретению является человек.

Композиции

В конкретных вариантах изобретения, антитела содержат последовательности V-домена или полноразмерные последовательности, представленные ниже, а также имеют Fc-мутации согласно изобретению, которые улучшают одну или несколько эффекторных функций Fc.

Полипептиды и антитела согласно изобретению могут также иметь и другие аминокислотные замены, которые, например, усиливают или ослабляют другие функции Fc или дополнительно улучшают эти функции Fc, повышают аффинность связывания с антигеном, повышают стабильность, изменяют характер гликозилирования или включают аллотипические варианты. Указанные антитела могут также содержать одну или несколько аминокислотных замен в Fc-области, которые будут сообщать антителу одно или несколько свойств, выбранных из повышенной аффинности связывания с Fc γ R, повышенной ADCC, повышенной CDC, пониженной CDC, улучшенной ADCC- и CDC-функции, повышенной ADCC-функции, но пониженной CDC-функции (например, для минимизации инфузионной реакции), повышенной аффинностью связывания с FcRn и увеличенного времени полужизни в сыворотке, по сравнению с полипептидом и антителами, имеющими Fc дикого типа. Такие активности могут быть измерены описанными здесь методами.

Другие аминокислотные модификации, улучшающие функцию Fc, можно найти в патенте США 6737056, описание которого вводится в настоящее изобретение посредством ссылки. Любые антитела согласно изобретению могут также иметь по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-области, снижающую CDC-активность, например, они могут иметь по меньшей мере замену в положении K322A. См. патент США № 6528624B1 (Idusogie et al.). Мутациями, улучшающими ADCC- и CDC-функцию, являются S298A/E333A/K334A, также называемые в настоящем изобретении тройным Ala-мутантом. K334L повышает уровень связывания с CD16. K322A снижает CDC-активность; K326A или K326W повышают CDC-активность, а D265A снижает ADCC-активность. Варианты гликозилирования, усиливающие ADCC-функцию, описаны в заявке WO 03/035835, которая вводится в настоящее изобретение посредством ссылки. Стабилизирующими вариантами являются варианты, повышающие стабильность, например, в отношении окисления и дезамидирования.

Рекомбинантный гуманизированный вариант анти-HER2 антитела мыши 4D5 (huMAb4D5-8, rhuMAbHER2, трастузумаб или герцептин®, патент США № 5821337) является клинически активным у пациентов, страдающих раком молочной железы с HER2-сверхэкспрессирующими метастазами и прошедших интенсивную противораковую терапию (Baselga et al., J. Clin. Oncol. 14:737-744 (1996)). Антитело трастузумаб, на промышленное производство которого было получено разрешение, выданное 25 сентября 1998 Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств, может быть использовано для лечения пациентов, страдающих раком молочной железы с метастазами, сверхэкспрессирующими белок HER2.

Другие анти-HER2 антитела с различными свойствами описаны в публикациях Tagliabue et al., Int. J. Cancer 47:933-937 (1991); McKenzie et al., Oncogene 4: 543-548 (1989); Maier et al., Cancer Res. 51:5361-5369 (1991); Bacus et al., Molecular Carcinogenesis 3:350-362 (1990); Stancovski et al., PNAS (USA) 88:8691-8695 (1991); Bacus et al. Cancer Research 52:2580-2589 (1992); Xu et al., Int. J. Cancer 53:401-408 (1993); WO

94/00136; Kazprzyk et al. Cancer Research 52:2771-2776 (1992); Hancock et al., Cancer Res. 51: 4575-4580 (1991); Shawver et al., Cancer Res. 54:1367-1373 (1994); Arteaga et al., Cancer Res. 54:3758-3765 (1994); Harwerth et al., J. Biol. Chem. 267:15160-15167 (1992); в патенте США № 5783186 и в публикации Klapper et al., Oncogene 14:2099-2109 (1997).

В одном из вариантов изобретения, анти-HER2 антитело содержит нижеследующие последовательности доменов VL и VH (CDR показаны жирным шрифтом):

VL гуманизованного варианта 2C4 антитела 574 (SEQ ID NO:3)

```

1      10      20      30      40      50      60
|      |      |      |      |      |      |
DIQMTQSPSSLSASVGRVTTITCKASQDVSIGVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASYRYTGVPS
10
      70      80      90      100     110     120
      |      |      |      |      |      |
RFGSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPTFGQGTKVEIK

```

и VH гуманизованного варианта 2C4 антитела 574 (SEQ ID NO:4)

```

15      10      20      30      40      50      60
|      |      |      |      |      |      |
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIY
20
      70      80      90      100     110     120
      |      |      |      |      |      |
NQRFKGRFFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLVTVSS

```

В другом варианте изобретения, анти-HER2 антитело трастузумаб содержит последовательности доменов VL (SEQ ID NO:5) и VH (SEQ ID NO:6), показанные на фигуре 2А и фигуре 2В.

В конкретных вариантах изобретения, анти-VEGF антитела согласно изобретению содержат нижеследующие последовательности:

В одном из вариантов изобретения, анти-VEGF антитело содержит последовательность VL (SEQ ID NO:7)

```

DIQMTQTTSS LSASLGDRVI ISCSASQDIS NYLNWYQQKPDGTVKVLIYF
30
TSSLHSGVPS RFGSGSGTD YSLTISNLEP EDIATYYCQQ YSTVPWTFGG
GTKLEIKR;

```

и

последовательность VH (SEQ ID NO:8)

```

EIQLVQSGPE LKQPGETVRI SCKASGYTFT NYGMNWVKQA PGKGLKWMGW
35
INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLETSASTAY LQISNLKNDD TATYFCAKYP
HYYGSSHWYF DVWGAGTTVT VSS;

```

В другом варианте изобретения, анти-VEGF антитело содержит последовательность VL (SEQ ID NO:9)

```

EIQLVQSGPE LKQPGETVRI SCKASGYTFT NYGMNWVKQA PGKGLKWMGW
40
INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLETSASTAY LQISNLKNDD TATYFCAKYP
HYYGSSHWYF DVWGAGTTVT VSS;

```

и

последовательность VH (SEQ ID NO:10)

```

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW
45
INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP
HYYGSSHWYF DVWGQGLVTVSS.

```

В третьем варианте изобретения, анти-VEGF антитело содержит последовательность VL (SEQ ID NO:11)

DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIIY TSSLHSGVPS
RFSGSGSGTD FTLLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTKVEIKR;

И

последовательность VH (SEQ ID NO:12)

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYDFT HYGMMWVRQA PGKGLEWVGW INTYTGPEPTY
AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP YYYGTSHWYF DVWGQGLTIVT
VSS

Гуманизованное анти-CD11a антитело эфализумаб или Raptiva® (патент США № 6037454), на промышленное производство которого было получено разрешение, выданное 27 октября 2003 Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств, может быть использовано для лечения пациентов, страдающих псориазом. В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к антителу против CD11a человека, имеющему мутации в Fc-области согласно изобретению, улучшающие одну или несколько эффекторных функций Fc, где указанное антитело содержит VL- и VH-последовательности HuMNM24, представленные ниже:

Вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO:13):

HuMNM24 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKTISKYLAWYQQKPGKAPKLLIY
1 10 20 30 40
HuMNM24 SGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLLTISSLQPEDFATYYCQQHNEYPLTFGQ
60 70 80 90 100

HuMNM24 GTKVEIKR

Вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO:14):

HuMNM24 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGHWMNWVRQAPGKGLEWV
1 10 20 30 40
HuMNM24 GMIHPSDSETRYNQKFKDRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
50 a 60 70 80 abc 90
HuMNM24 GIYFYGTTFYFDYWGQGLTIVTVSS
100 110

Антитело против CD11a человека может содержать VH SEQ ID NO:14 и полноразмерную L-цепь HuMNM24, имеющую последовательность:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKTISKYLAWYQQKPGKAPKLLIYS
GSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLLTISSLQPEDFATYYCQQHNEYPLTFGQ
GTKVEIKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHNQ
LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 15)

В конкретных вариантах изобретения, анти-IgE антитела, имеющие Fc-мутации согласно изобретению, которые улучшают одну или несколько эффекторных функций Fc, содержат по меньшей мере последовательности V-области анти-IgE антител E25, E26, E27 и Hu-901, последовательности L- и H-цепи которых представлены на фигурах 3А и 3В. Последовательностями легкой цепи являются: L-цепь E25 (SEQ ID NO:16); L-цепь E26 (SEQ ID NO:17); L-цепь E27 (SEQ ID NO:18) и L-цепь Hu-901 (SEQ ID NO:19). Последовательностями тяжелой цепи являются: H-цепь E25 (SEQ ID NO:20); H-цепь E26 (SEQ ID NO:21); H-цепь E27 (SEQ ID NO:22) и H-цепь Hu-901 (SEQ ID NO:23). В анти-IgE антителах, представленных на фигурах 3А и 3В, VL-область заканчивается последовательностью VEIK (остаток 111 на фигуре 3А), а VH-область заканчивается последовательностью VTVSS (приблизительно в положении остатка #121 на фигуре 3В). Последовательностями VL антител E25, E26,

Е27 и Hu-901 являются последовательности SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:51 и SEQ ID NO:53, соответственно. Последовательностями VH антител E25, E26, E27 и Hu-901 являются последовательности SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52 и SEQ ID NO:54, соответственно. В другом варианте изобретения, анти-IgE антитела, имеющие Fc-мутации согласно изобретению, содержат L-цепь, выбранную из L-цепей антител, последовательности которых представлены на фигуре 3A: L-цепи E25 (SEQ ID NO:16); L-цепи E26 (SEQ ID NO:17); L-цепи E27 (SEQ ID NO:18) и L-цепи Hu-901 (SEQ ID NO:19).

Примерами антител, которые связываются с антигеном CD20, являются: антитело "С2В8", называемое в настоящее время "ритуксимабом" (RITUXAN®)(патент США № 5736137, полное описание которого вводится в настоящее изобретение посредством ссылки); ⁹⁰Y-меченное антитело 2В8 мыши, обозначаемое "Y2D8" или называемое "ибритумомаб Тиуксетан" ZEVALIN® (патент США № 5736137, полное описание которого вводится в настоящее изобретение посредством ссылки); IgG2a "В1" мыши, также называемое "Тозитумомабом", и необязательно меченное ¹³¹I, и называемое "антителом "131I-В1" (¹³¹I-меченный тозитумомаб, ВЕХХАР™)(патент США № 5595721, полное описание которого вводится в настоящее изобретение посредством ссылки); моноклональное антитело "1F5" мыши (Press et al., Blood 69(2):584-591 (1987) и его варианты, включая антитела с "каркасными пэтчами" или гуманизованное 1F5 (WO03/002607, Leung S.); депозит ATCC HB-96450); 2Н7 мыши и химерное антитело 2Н7 (Clark et al., PNAS 82: 1766-1770 (1985); патент США № 5500362, полное описание которого вводится в настоящее изобретение посредством ссылки); гуманизованное 2Н7; huMax-CD20 (WO 04/035607, Genmab, Denmark); АМЕ-133 (Applied Molecular Evolution); антитело А20 или его варианты, такие как химерное или гуманизованное антитело А20 (сА20, hА20, соответственно)(US 2003/0219433, Immunomedics); и моноклональные антитела L27, G28-2, 93-1В3, В-С1 или NU-В2, обсуждаемые на Международном симпозиуме по типированию лейкоцитов (Valentine et al., Leukocyte Typing III (McMichael, Ed., p.440, Oxford University Press (1987)).

Используемые здесь термины "ритуксимаб" или "ритуксан" (RITUXAN®) означают генетически сконструированное химерное моноклональное антитело мыши/человека, направленное против антигена CD20 и обозначенное "С2В8" в патенте США № 5736137, полное описание которого вводится в настоящее изобретение посредством ссылки, включая фрагменты указанного антитела, которые сохраняют способность связываться с CD20. Последовательности легкой цепи (SEQ ID NO:24) и тяжелой цепи (SEQ ID NO:25) С2В8 представлены на фигуре 10. Представлены также последовательности V_L и V_H.

В конкретных вариантах изобретения, антителами, которые связываются с антигеном CD20, являются гуманизованное антитело 2Н7v.16 и его варианты, описанные ниже. Термин "гуманизованное антитело 2Н7v.16" означает интактное антитело или фрагмент антитела, содержащие последовательность вариабельной области легкой цепи:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:1);

и

последовательность вариабельной области тяжелой цепи:
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGGAIYPGNGDTSYNQKF KGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSNSYWYFDVWGQGTILVTVSS (SEQ ID NO: 2)

Если гуманизованным антителом 2H7v.16 является интактное антитело, то предпочтительно, чтобы оно содержало полноразмерную аминокислотную последовательность легкой цепи v16:

легкая цепь 2H7v.16:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSR
 FSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
 DEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTL
 SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 26);

и полноразмерную аминокислотную последовательность тяжелой цепи:

тяжелая цепь 2H7v.16:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG
 YFTFSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL
 RAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
 LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN
 VNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDVLNGLKEYKC
 KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNQQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPGK (SEQ ID NO: 27).

V-область всех других вариантов, полученных на основе варианта 16, имеет аминокислотные последовательности v16, за исключением положений аминокислотных замен, указанных в нижеприведенной таблице. Если это не указано ниже, то варианты 2H7 имеют такую же L-цепь, как и цепь v16.

Вариант 2H7	Замены в тяжелой цепи (V _H)	Замены в легкой цепи (V _L)	Замены в Fc
16			-
31	-	-	S298A, E333A, K334A
73	N100A	M32L	
75	N100A	M32L	S298A, E333A, K334A
96	D56A, N100A	S92A	
114	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A
115	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, E356D, M358L
116	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, R334A, K322A
138	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A
477	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A, N434W
375	-	-	K334L

Каждый из вариантов 114, 115, 116, 138, 477 и 511 содержит последовательность VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 41)

Каждый из вариантов 96, 114, 115, 116, 138 и 477 содержит последовательность VH: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYFTFSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 42)

Вариантом предшествующего гуманизованного mAb 2H7 является вариант 2H7v.31, имеющий последовательность VL (SEQ ID NO:1) и VH (SEQ ID NO:2), и последовательность L-цепи (SEQ ID NO:26), аналогичные последовательностям вышеуказанного варианта v16, где полноразмерная аминокислотная последовательность H-цепи представлена ниже:

H-цепь 2H7v.31:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKF
KGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGLTVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
5 KVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO: 28).

Другим вариантом гуманизованного антитела 2H7 является вариант 2H7v.138,
имеющий последовательность L-цепи SEQ ID NO:39 и последовательность H-цепи SEQ
10 ID NO:40, представленные ниже:

легкая цепь 2H7v.138 (SEQ ID NO:39):

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
15 DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

тяжелая цепь 2H7v.138 (SEQ ID NO:40):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG
20 YFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARVVYYSASYWFYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
25 KVSNAALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

Гуманизованный вариант 2H7v.477 имеет последовательность L-цепи SEQ ID NO:39
и последовательность H-цепи SEQ ID NO:43 (с аминокислотной заменой N434W):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG
YTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARVVYYSASYWFYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
35 VNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK (SEQ ID NO: 43).

Другие варианты v138 имеют аминокислотную замену N434Y или N434F.

40 Вариант 2H7v.114 имеет полноразмерную последовательность L-цепи SEQ ID NO:39
и полноразмерную аминокислотную последовательность H-цепи:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG
YTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARVVYYSASYWFYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
45 VNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK (SEQ ID NO: 44).

50 Вариант 2H7v.511 содержат V_L SEQ ID NO:41, представленную выше, и VH SEQ ID
NO:45:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATS
YNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSRYWFYFDVWGQGLTVTV
SS (SEQ ID NO. 45)

и VH SEQ ID NO:45:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPNGATS
 YNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVVYYSYRYWYFDVWGQGLVTV
 SS (SEQ ID NO. 45)

5 2H7.v511 имеет представленную выше последовательность легкой цепи SEQ ID NO:
 39 и последовательность тяжелой цепи:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPNGATS
 YNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVVYYSYRYWYFDVWGQGLVTV
 10 SSASTKGPSTVPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 15 YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO. 46).

Настоящее изобретение также относится к анти-BR3 антителам, содержащим
 15 замену в положении N434 ароматическими остатками F, Y, H или S.

Способы осуществления изобретения

Настоящее изобретение также относится к способу скрининга полипептида,
 обладающего высокой аффинностью связывания с FcRn при pH 6,0, и более низкой
 аффинностью связывания при pH 7,4, чем при pH 6,0, как описано в примерах.
 20 Указанный способ включает экспрессию полипептида-кандидата на фаге,
 получение huFcRn, иммобилизованного на твердой матрице, связывание фаговых
 частиц с указанным FcRn на такой матрице, удаление несвязанных фаговых частиц
 путем проведения множества раундов промывок в условиях возрастающей жесткости
 25 для каждого раунда, и элюирование оставшегося связанного фага при pH 7,4. Как
 описано в примере 1, условия возрастающей жесткости не означают увеличение числа
 и/или времени проведения промывок. Элюированный фаг может быть размножен, и из
 этого фага может быть выделен полипептид. В одном из вариантов изобретения,
 указанным полипептидом является полипептид, содержащий Fc IgG, такой как
 30 антитело или иммуноадгезин.

Получение антител

Моноклональные антитела

Моноклональные антитела могут быть получены с применением гибридомной
 35 технологии, впервые описанной Kohler et al. Nature, 256:495 (1975), либо они могут
 быть получены методами рекомбинантных ДНК (патент США № 4816567).

В гибридном методе, мышь или другое подходящее животное-хозяин, такое как
 хомячок, иммунизируют как описано выше, для выработки у них лимфоцитов,
 продуцирующих или способных продуцировать антитела, специфически
 40 связывающиеся с белком, используемым для иммунизации. Альтернативно,
 лимфоциты могут быть введены методом иммунизации *in vitro*. После иммунизации,
 лимфоциты выделяют и подвергают, а затем подвергают слиянию с миеломной
 клеточной линией с использованием подходящего агента для слияния, такого как
 45 полиэтиленгликоль, в результате чего образуются гибридомные клетки (Goding,
 Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

Полученные таким образом гибридомные клетки высевают и культивируют в
 подходящей культуральной среде, которая, предпочтительно, содержит одно или
 несколько веществ, ингибирующих рост или выживание не-слитых родительских
 50 миеломных клеток (также называемых партнерами по слиянию). Так, например, если
 родительские миеломные клетки не содержат фермента
 гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (HGPRT или HPRT), то селективная

культуральная среда для получения гибридом обычно включает гипоксантин, аминокперин и тимидин (среда НАТ), то есть, вещества, предупреждающие рост HGPRT-дефицитных клеток.

5 Предпочтительными миеломными клетками-партнерами по слиянию являются клетки, которые способны подвергаться эффективному слиянию, поддерживать стабильное продуцирование высоких уровней антител выбранными антитело-продуцирующими клетками и являются чувствительными к селективной среде, которая позволяет дифференцировать слитые клетки от неслитых родительских
10 клеток. Предпочтительными миеломными клеточными линиями являются миеломные линии мыши, такие как клеточные линии, происходящие от клеток МОРС-21 и МРС-11 опухолей мыши, которые могут быть получены из Института исследований по распределению клеток им. Солка (Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA), и клеток SP-2 и их производных, например, клеток X63-Ag8-653,
15 имеющих в Американской коллекции типовых культур, Rockville, Maryland USA. Для продуцирования моноклональных антител человека также используются миеломные клеточные линии человека и гетеромиеломные клеточные линии “мышь-человек” (Kozbor J. Immunol., 133:3001 (1984) & Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).
20

Культуральную среду для роста гибридомных клеток анализируют на продуцирование моноклональных антител против данного антигена. Специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых гибридомными клетками, определяют, предпочтительно, путем иммунопреципитации или путем проведения *in vitro*
25 анализа на связывание, такого как радиоиммуноанализ (РИА) или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

Аффинность связывания моноклонального антитела может быть, например, определена с помощью анализа Скэтчарда, описанного Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).
30

После идентификации гибридомных клеток, которые продуцируют антитела с нужной специфичностью, аффинностью и/или активностью, клоны могут быть субклонированы путем проведения процедур лимитирующего разведения и культивированы стандартными методами (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Подходящими культуральными средами, предназначенными для достижения данной цели, являются, например, среда D-MEM или RPMI-1640. Кроме того, гибридомные клетки могут быть выращены *in vivo* в качестве асцитных опухолей у животных, например, путем *i.p.* инъекции этих клеток мышам.
40

Моноклональные антитела, секретированные субклонами, соответствующим образом выделяют из культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки путем проведения стандартных процедур очистки антител, таких как, например, аффинная хроматография (например, на белке А или на G-белке-Сефарозе), или ионообменная хроматография, хроматография на гидроксиапатитах, гель-электрофорез, диализ и т.п.
45

ДНК, кодирующая моноклональные антитела, может быть легко выделена и секвенирована в соответствии со стандартными процедурами (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антител мыши). Предпочтительным источником такой ДНК служат гибридомные клетки. После выделения, эта ДНК может быть встроена в экспрессионные векторы, которые затем трансфецируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E.coli*, обезьяньи клетки COS,
50

клетки яичника китайского хомячка (СНО) или миеломные клетки, которые, в иных случаях, не продуцируют белок антитела, в результате чего, в этих рекомбинантных клетках-хозяевах синтезируются моноклональные антитела. Обсуждение рекомбинантной экспрессии антитело-кодирующей ДНК в бактериях можно найти в 5 статьях Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) и Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

В другом варианте изобретения, моноклональные антитела или фрагменты антител могут быть выделены из фаговой библиотеки антител, созданной методами, 10 описанными McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990). В работе Clackson et al. *Nature*, 352:624-628 (1991) и Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) описано выделение антител мышей и человека, соответственно, с использованием фаговых библиотек. В более поздних публикациях описано продуцирование высокоаффинных (порядка нМ) антител человека посредством перестановки цепей антитела (Marks et al.

15 *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), а также путем комбинированного инфицирования и рекомбинации *in vivo*, применяемой в качестве стратегии для конструирования очень больших фаговых библиотек (Waterhouse et al. *Nucl. Acids. Res.* 21:2265-2266 (1993)). Таким образом, эти методы являются приемлемой альтернативой традиционной 20 гибридной технологии, применяемой для выделения моноклональных антител.

ДНК, кодирующая антитело, может быть модифицирована так, чтобы она продуцировала полипептиды химерного или гибридного антитела, например, путем замены последовательности, кодирующей константные домены тяжелой цепи и легкой цепи (C_H и C_L) антитела человека, гомологичными последовательностями антител 25 мышцы (патент США № 4816567 и Morrison et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851 (1984)), или путем присоединения иммуноглобулин-кодирующей последовательности ко всей или части кодирующей последовательности не-иммуноглобулинового полипептида (гетерологичного полипептида). Такие не-иммуноглобулиновые полипептидные 30 последовательности могут быть заменены константными доменами антитела, либо они могут быть заменены переменными доменами одного антигенсвязывающего сайта антитела для создания химерного двухвалентного антитела, содержащего один антигенсвязывающий сайт, обладающий специфичностью к одному антигену, и другой антигенсвязывающий сайт, обладающий специфичностью к другому антигену.

35 *Гуманизованные антитела*

Методы гуманизации не-человеческих антител описаны в литературе. Предпочтительно, гуманизованное антитело имеет один или несколько введенных в него аминокислотных остатков, происходящих от источника, не относящегося к 40 человеку. Эти не-человеческие аминокислотные остатки часто называют "импортными" остатками, которые обычно берут из "импортного" переменного домена. Такая гуманизация может быть осуществлена, в основном, методом Винтера (Winter) и сотрудниками (Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoyen et al., *Science* 239:1534-1536 (1988)), путем 45 замены соответствующих последовательностей антитела человека последовательностями гипервариабельной области. В соответствии с этим, такие "гуманизованные" антитела представляют собой химерные антитела (патент США № 4816567), в которых, в основном, меньшая часть, по сравнению с интактным 50 переменным доменом антитела человека, заменена соответствующей последовательностью от не-человеческого антитела. Фактически, гуманизованные антитела обычно представляют собой антитела человека, в которых некоторые остатки гипервариабельной области и, возможно, некоторые остатки FR заменены

остатками, происходящими от аналогичных сайтов антител грызунов.

Для снижения антигенности и НАМА-ответа (вырабатывания антимышиного антитела человека) при создании гуманизованных антител, необходимых для терапевтического введения человеку, очень важно выбрать варьируемые домены как легкой, так и тяжелой цепи антитела человека. В соответствии с так называемым методом “подгонки”, последовательность варьируемого домена антитела грызуна скринируют по всей библиотеке известных последовательностей варьируемых доменов антитела человека. Затем идентифицируют последовательность V-домена человека, которая имеет наибольшее сходство с последовательностью грызунов, и присутствующую в ней каркасную область человека (FR) используют для создания гуманизованного антитела (Sims et al., J. Immunol. 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901 (1987)). В другом методе используют конкретную каркасную область, происходящую от консенсусной последовательности всех антител человека конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Та же самая каркасная область может быть использована для получения нескольких различных гуманизованных антител (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol, 151:2623 (1993)).

Кроме того, важно, чтобы гуманизованные антитела сохраняли высокую аффинность связывания с антигеном и другие благоприятные биологические свойства. Для достижения этой цели, в соответствии с предпочтительным способом, гуманизованные антитела получают путем анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизованных продуктов с использованием трехмерных моделей родительских и гуманизованных последовательностей. Трехмерные иммуноглобулиновые модели являются общедоступными и хорошо известны специалистам. Существуют компьютерные программы, которые иллюстрируют и представляют вероятные трехмерные конформационные структуры выбранных последовательностей-кандидатов иммуноглобулинов. Исследование этих представлений позволяет проанализировать вероятную роль данных остатков в функционировании последовательностей-кандидатов иммуноглобулина, то есть остатков, которые влияют на способность иммуноглобулина-кандидата связываться с его антигеном. Таким образом, остатки FR могут быть отобраны из последовательностей реципиента и “импортных” последовательностей и объединены, в результате чего может быть получено желаемое антитело с нужными свойствами, такими как повышенная аффинность по отношению к антигену(ам)-мишени(ям). Вообще говоря, остатки гиперварируемой области непосредственно влияют на связывание с антигеном, и в основном, участвуют в таком связывании.

Гуманизованным антителом может быть фрагмент антитела, такой как Fab, который может быть, но необязательно, конъюгирован с одним или несколькими цитотоксическими средствами с получением иммуноконъюгата. Альтернативно, таким гуманизованным антителом может быть полноразмерное антитело, такое как полноразмерное антитело IgG1.

Антитела человека и метод фагового представления

В качестве альтернативы гуманизованным антителам могут быть продуцированы антитела человека. Так, например, в настоящее время могут быть получены трансгенные животные (например, мыши), которые, после иммунизации, способны продуцировать полный репертуар антител человека без продуцирования эндогенного иммуноглобулина. Так, например, сообщалось, что гомозиготная делеция гена области стыка в тяжелой цепи (J_H) антитела у химерных мышей и мышей, мутантных

по зародышевой линии, приводит к полному ингибированию продуцирования эндогенного антитела. Перенос набора генов иммуноглобулина зародышевой линии человека мышам, мутантным по зародышевой линии, может приводить к продуцированию антител человека после стимуляции антигеном. См. например, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature 362: 255-258 (1993); Bruggerman et al., Year in Immuno, 7:33 (1993) и патенты США №№ 5545806, 5569825, 5591669 (все от GenPharm), 5545807 и заявку WO 97/17852.

Альтернативно, для продуцирования антител человека и фрагментов антител *in vitro* из набора генов варибельного домена (V) иммуноглобулина, происходящего от неиммунизованных доноров, может быть применена технология фагового представления (McCafferty et al. Nature 348:552-553 [1990]). В соответствии с этой технологией, гены домена V антитела клонируют с сохранением рамки считывания в ген главного или минорного белка оболочки нитчатого бактериофага, такого как M13 или fd, и представляют в качестве функциональных фрагментов антитела на поверхности фаговой частицы. Поскольку нитеобразная частица содержит копию одноцепочечной ДНК фагового генома, то отбор на основе функциональных свойств антитела также позволяет проводить отбор гена, кодирующего антитело, обладающее этими свойствами. Таким образом, фаг имитирует некоторые свойства В-клеток. Фаговое представление может быть осуществлено в различных форматах; см., например, обзор в работе Johnson, Kevin S. и Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993). Для осуществления фагового представления может быть использовано несколько источников V-генных сегментов. Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) выделили массив разнообразных антиоксазолонных антител из небольшой рандомизированной комбинаторной библиотеки генов V, полученных из селезенки иммунизованных мышей. При этом может быть сконструирован набор генов V от неиммунизованных людей-доноров, а затем могут быть выделены антитела против массива различных антигенов (включая аутоантигены), в основном, в соответствии с методами, описанными Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991) или Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993). См. также патенты США №№ 5565332 и 5573905.

Как обсуждалось выше, антитела человека могут также продуцироваться *in vitro* активированными В-клетками (см. патенты США №№ 5567610 и 5229275).

Фрагменты антител

В некоторых случаях, предпочтительнее использовать не целые антитела, а фрагменты антител. Чем меньше размер фрагментов, тем быстрее их клиренс, и тем легче осуществляется их доступ к солидным опухолям.

Для получения фрагментов антител были разработаны различные методы. Традиционно эти фрагменты образуются в результате протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) и Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)). Однако такие фрагменты могут продуцироваться непосредственно рекомбинантными клетками-хозяевами. Fab-, Fv- и scFv-фрагменты антител могут экспрессироваться в *E.coli* и секретироваться из *E.coli*, что облегчает продуцирование большого количества этих фрагментов. Фрагменты антител могут быть выделены из фаговых библиотек антител, обсуждаемых выше. Альтернативно, Fab'-SH-фрагменты могут быть непосредственно выделены из *E.coli* и химически связаны с образованием F(ab')₂-фрагментов (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). В соответствии с другим подходом F(ab')₂-фрагменты могут быть выделены непосредственно из

культуры рекомбинантной клетки-хозяина. Fab- и F(ab')₂-фрагменты, имеющие более продолжительное время полужизни *in vivo* и содержащие остатки эпитопа, связывающегося с рецептором “спасения”, описаны в патенте США № 5869046.

5 Специалистам известны и другие методы получения фрагментов антител. В других вариантах изобретения выбранным антителом является одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv). См. WO 93/16185, патент США № 5571894 и патент США № 5587458. Fv и sFv представляют собой только молекулы с интактными связывающими сайтами, не содержащими константных областей; а поэтому они могут
10 быть использованы для снижения уровня неспецифического связывания при их применении *in vivo*. Гибридные scFv-белки могут быть сконструированы с получением гибрида эффекторного белка, содержащего sFv либо у amino-конца, либо у карбокси-конца. См. выше публикацию “Antibody Engineering”, ed. Borrebaeck. Фрагментом антитела может быть также “линейное антитело”, например, антитело,
15 описанное в патенте США № 5641870. Такие фрагменты линейных антител могут быть моноспецифическими или биспецифическими.

Биспецифические антитела

Биспецифическими антителами являются антитела, которые обладают
20 специфичностью связывания по меньшей мере с двумя различными эпитопами. Репрезентативные биспецифические антитела могут связываться с двумя различными эпитопами белка CD20. Другие такие антитела могут включать сайт связывания с CD20 и сайт связывания с другим белком. Альтернативно, ветвь анти-CD20 антитела может быть объединена с ветвью, связывающейся со стимулирующей молекулой,
25 присутствующей на лейкоците, такой как молекула T-клеточного рецептора (например, CD3), или Fc-рецепторов для IgG (FcγR), таких как FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16), или NKG2D или другого лиганда, активирующего NK-клетки, в результате чего клеточные защитные механизмы будут направлены на
30 CD20-экспрессирующие клетки и позволят определить локализацию этих клеток. Биспецифические антитела могут быть также использованы для определения локализации цитотоксических агентов в клетках, экспрессирующих CD20. Эти антитела имеют ветвь, связывающуюся с CD20, и ветвь, связывающуюся с
35 цитотоксическим агентом (например, с сапорином, антителом против интерферона-α, винкаалкалоидом, цепью рицина А, метотрексатом или гаптенем, меченным радиоактивным изотопом). Биспецифические антитела могут быть продуцированы в виде полноразмерных антител или в виде фрагментов антител (например, F(ab')₂-фрагментов биспецифических антител).

40 В WO96/16673 описано биспецифическое анти-ErbB2/анти-FcγRIII антитело, а в патенте США № 5837234 описано биспецифическое анти-ErbB2/анти-FcγRI антитело. В WO 98/02463 описано биспецифическое анти-ErbB2/Fcα антитело. В патенте США № 5821337 описано биспецифическое анти-ErbB2/анти-CD3 антитело.

45 Методы продуцирования биспецифических антител известны специалистам. Традиционное продуцирование полноразмерных биспецифических антител основано на коэкспрессии двух пар тяжелой цепи-легкой цепи иммуноглобулина, где указанные две цепи обладают различными специфичностями (Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)). Из-за рандомизированного набора тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина,
50 эти гибридомы (квадромы) продуцируют потенциальную смесь из 10 различных молекул антител, из которых только одна молекула имеет “правильную” биспецифическую структуру. Очистка такой “правильной” молекулы, которую обычно осуществляют путем проведения стадий аффинной хроматографии,

представляет значительные трудности и дает низкий выход продукта. Аналогичные процедуры описаны в WO 93/08829 и у Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

В соответствии с другим подходом переменные домены антитела с нужными специфичностями связывания (сайты связывания "антитело-антиген") присоединяют к последовательностям константного домена иммуноглобулина. Такое слияние, предпочтительно, осуществляют с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина Ig, содержащим по меньшей мере часть шарнирной области, C_H2 и C_H3. При этом, предпочтительно, чтобы этот гибрид имел первую константную область тяжелой цепи (C_H1), содержащую сайт, необходимый для связывания с легкой цепью, присутствующей по меньшей мере в одном из гибридов. ДНК, кодирующую гибриды тяжелой цепи иммуноглобулина и, если это необходимо, легкой цепи иммуноглобулина, встраивают в отдельные экспрессионные векторы, и ко-трансфецируют в подходящую клетку-хозяина. Это обеспечивает более высокую степень гибкости при коррекции соотношений трех полипептидных фрагментов в тех вариантах изобретения, в которых неравные содержания трех полипептидных цепей, используемых в данной конструкции, дают оптимальные выходы нужного биспецифического антитела. Однако можно встраивать кодирующие последовательности для двух или всех трех полипептидных цепей в один экспрессионный вектор, если экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей при равном соотношении дает высокие выходы, или если такие соотношения не оказывают значительного влияния на выход нужной комбинации цепей.

В предпочтительном варианте такого подхода биспецифические антитела состоят из гибридной тяжелой цепи иммуноглобулина, обеспечивающей первую специфичность связывания, в одной ветви, и гибридной пары "тяжелая цепь - легкая цепь" иммуноглобулина (обеспечивающей вторую специфичность связывания), в другой ветви. Было обнаружено, что эта асимметричная структура облегчает отделение нужного биспецифического соединения от нежелательных комбинаций цепей иммуноглобулина, поскольку присутствие легкой цепи иммуноглобулина только в одной половине биспецифической молекулы обеспечивает простой способ его выделения. Этот способ описан в WO 94/04690. Более подробное описание получения биспецифических антител, можно найти, например, в публикации Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

В соответствии с другим подходом, описанным в патенте США № 5731168, может быть сконструирована пограничная область между парой молекул антитела в целях максимизации процента гетеродимеров, выделенных из рекомбинантной клеточной культуры. Такая граница, предпочтительно, содержит по меньшей мере часть домена C_H3. В этом методе, небольшие боковые цепи одной или нескольких аминокислот в пограничной области первой молекулы антитела заменяют более крупными боковыми цепями (например, тирозина или триптофана). В пограничной области второй молекулы антитела создают компенсирующие "полости", имеющие размер, идентичный или аналогичный размеру более крупной(ых) боковой(ых) цепи(ей), путем замены крупных боковых цепей аминокислот более мелкими боковыми цепями (например, аланина или треонина). Это позволяет увеличить выход гетеродимеров по отношению к другим нежелательным конечным продуктам, таким как гомодимеры.

Биспецифические антитела включают перекрестно-связанные антитела или их "гетероконъюгаты". Так, например, одно из антител в указанном гетероконъюгате может быть связано с авидином, а другое с биотином. Такие антитела были,

например, предложены для доставки клеток иммунной системы к нежелательным клеткам (патент США № 4676980) и для лечения ВИЧ-инфекций (WO 91/00360, WO 92/200373 и EP 03089). Антитела-гетероконъюгаты могут быть получены любыми стандартными методами перекрестного связывания. Подходящие

5 перекрестно-связывающие агенты хорошо известны специалистам и описаны в патенте США № 4676980 наряду с различными методами перекрестного связывания.

Методы продуцирования биспецифических антител из фрагментов антител также описаны в литературе. Так, например, биспецифические антитела могут быть
10 получены путем химического связывания. В работе Brennan et al., Science, 229:81 (1985) описана процедура, в которой интактные антитела подвергают протеолитическому расщеплению с образованием F(ab')₂-фрагментов. Эти фрагменты восстанавливают в присутствии агента, образующего дитиоловый комплекс, такого как арсенит натрия, для стабилизации смежных дитиолов и для предотвращения образования
15 межмолекулярных дисульфидных связей. Затем полученные Fab'-фрагменты превращают в производные тионитробензоата (TNB). После этого, одно из производных Fab'-TNB снова превращают в Fab'-тиол путем восстановления меркаптоэтиламинам и смешивают с эквимольным количеством другого
20 производного Fab'-TNB, в результате чего получают биспецифическое антитело. Продуцированные таким образом биспецифические антитела могут быть использованы в качестве агентов для селективной иммобилизации ферментов.

Наблюдающийся в последнее время прогресс в данной области позволяет осуществлять непосредственное выделение Fab'-SH-фрагментов из *E.coli*, которые
25 могут быть химически связаны с образованием биспецифических антител. В публикации Shalaby et al., J. Exp. Med., 175:217-225 (1992) описано продуцирование полностью гуманизированной молекулы F(ab')₂-фрагмента биспецифического антитела. Каждый Fab'-фрагмент отдельно секретируется из *E.coli* и был подвергнут прямому
30 химическому связыванию *in vitro* с образованием биспецифического антитела. Полученное таким образом биспецифическое антитело обладает способностью связываться с клетками, сверхэкспрессирующими рецептор ErbB2 и с нормальными Т-клетками человека, а также запускать литическую активность цитотоксических
35 лимфоцитов человека, направленную против клеток-мишеней опухоли молочной железы человека.

Были также описаны другие методы получения и выделения фрагментов биспецифических антител непосредственно из рекомбинантной клеточной культуры. Так, например, биспецифические антитела были продуцированы с использованием
40 "лейциновых молний". Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992). Пептиды лейциновой молнии, происходящие от белков Fos и Jun, были присоединены к Fab'-частям двух других антител путем лигирования генов. Гомодимеры антитела были восстановлены в шарнирной области с образованием мономеров, а затем снова окислены с образованием гетеродимеров данного антитела. Этот метод может быть
45 также использован для продуцирования гомодимеров антитела. Технология "диантител", описанная Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90:6444-6448 (1993), дает альтернативный механизм получения фрагментов биспецифического антитела. Эти фрагменты содержат V_H, присоединенный к V_L посредством линкера, который
50 является слишком коротким для создания пары между двумя доменами одной и той же цепи. В соответствии с этим, V_H- и V_L-домены одного фрагмента вынуждены спариваться с комплементарными V_L- и V_H-доменами другого фрагмента, образуя тем

самым два антигенсвязывающих сайта. Также была описана другая стратегия получения фрагментов биспецифических антител с использованием одноцепочечных Fv(sFv)-димеров. См. Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Рассматриваются также антитела с более чем двумя валентностями. Так, например, могут быть получены и триспецифические антитела. Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991).

Поливалентные антитела

Поливалентное антитело может быть интернализировано (и/или катаболизировано) клетками, экспрессирующими антиген, с которым связываются антитела, быстрее, чем двухвалентное антитело. Антитела согласно изобретению могут представлять собой поливалентные антитела (не относящиеся к классу IgM) с тремя или более антигенсвязывающими сайтами (например, четырехвалентные антитела), которые могут быть легко продуцированы путем рекомбинантной экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидные цепи антитела. Такое поливалентное антитело может содержать домен димеризации и три или более антигенсвязывающих сайтов. Предпочтительный домен димеризации содержит (или состоит из) Fc-область(и) или шарнирную(ой) область(и). В этом случае, указанное антитело содержит Fc-область и три или более антигенсвязывающих сайтов, находящихся у amino-конца по отношению к Fc-области. Предпочтительное поливалентное антитело согласно изобретению содержит примерно от трех до восьми, а предпочтительно, четыре антигенсвязывающих сайта (или состоит из них). Указанное поливалентное антитело содержит по меньшей мере одну полипептидную цепь (а предпочтительно, две полипептидных цепи), где указанная(ые) полипептидная(ые) цепь(и) содержит(ат) два или более переменных доменов. Так, например, полипептидная(ые) цепь(и) может(ут) содержать VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, где VD1 представляет собой первый переменный домен, VD2 представляет собой второй переменный домен, Fc представляет собой одну полипептидную цепь Fc-области, X1 и X2 представляют собой аминокислоту или полипептид, а n равно 0 или 1. Так, например, указанная(ые) полипептидная(ые) цепь(и) может(гут) содержать цепь: VH-CH1-гибкий линкер-VH-CH1-Fc-область или цепь: VH-CH1-VH-CH1-Fc-область. Используемое здесь поливалентное антитело, кроме того, предпочтительно, содержит по меньшей мере два (а предпочтительно, четыре) полипептида переменного домена легкой цепи. Описанное здесь поливалентное антитело может содержать, например, примерно от двух до восьми полипептидов переменного домена легкой цепи. Рассматриваемые здесь полипептиды переменного домена легкой цепи содержат переменный домен легкой цепи, и кроме того, но необязательно, CL-домен.

Векторы, клетки-хозяева и методы рекомбинантных ДНК

Отбор и трансформация клеток-хозяев

Клетками-хозяевами, подходящими для клонирования или экспрессии описанных здесь рекомбинантных mAb, иммуноадгезинов и других полипептидов-антагонистов, являются клетки прокариотов, дрожжей или высших эукариотов. Подходящими прокариотами, используемыми для этих целей, являются эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные микроорганизмы, например, энтеробактерии, такие как *Escherichia*, например, *E.coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, например, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, например, *Serratia marcescans* и *Shigella*, а также *Bacilli*, такие как *B. subtilis* и *B. licheniformis* (например, *B. licheniformis* 41P, описанная в DD266710, опубликованной 12 апреля 1989), *Pseudomonas*, такие как *P.aeruginosa* и *Streptomyces*. Одним из предпочтительных клонирующих хозяев *E.coli* является штамм *E.coli* 294 (ATCC 31446), хотя могут быть

использованы и другие штаммы, такие как *E.coli* B, *E.coli* X1776 (ATCC 31537) и *E.coli* W3110 (ATCC 27325). Эти примеры приводятся в иллюстративных целях и не ограничивают объем изобретения.

5 Полноразмерное антитело, фрагменты антител и гибридные белки антител могут быть продуцированы в бактериях, а особенно, в тех случаях, когда нет необходимости в гликозилировании и в сообщении эффекторной функции Fc, например, когда
указанное терапевтическое антитело конъюгировано с цитотоксическим средством (например, токсином), и сам иммуноконъюгат является эффективным в отношении
10 деструкции опухолевых клеток. Полноразмерные антитела имеют продолжительное время полужизни в кровотоке. Продуцирование антител в *E.coli* является более быстрым и менее дорогостоящим. Описание экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях можно найти, например, в патенте США № 5648237 (Carter et al.), в патенте США № 5789199 (Joly et al.) и в патенте США № 5840523 (Simmons et al.), где описаны области инициации трансляции (TIR) и сигнальные
15 последовательности для оптимизации экспрессии и секреции, и эти патенты вводятся в настоящее описание посредством ссылки. После экспрессии, указанное антитело выделяют из клеточной массы *E.coli* в растворимые фракции, а затем оно может быть
20 очищено, например, на колонке с белком А или с G-белком, в зависимости от его изоформа. Конечная очистка может быть осуществлена способом, аналогичным способу очистки антител, экспрессируемых, например, в клетках CHO.

Помимо прокариотов, подходящими клонирующими или экспрессирующими хозяевами для антитело-кодирующих векторов, таких как анти-CD20
25 антитело-кодирующие векторы, являются эукариотические микробы, такие как нитчатые грибы или дрожжи. Из низших эукариотических микроорганизмов-хозяев, наиболее часто используемыми являются *Saccharomyces cerevisiae* или обычные пекарские дрожжи. Однако в настоящем изобретении используются общедоступные
30 различные бактерии другого рода и вида и их различные штаммы, такие как *Schizosaccharomyces pombe*; клетки-хозяева *Kluyveromyces*, такие как *K.lactis*, *K.fragilis* (ATCC 12424), *K.bulgaricus* (ATCC 16045), *K.wickerhamii* (ATCC 24178), *K.waltii* (ATCC 56500), *K.drosophilarum* (ATCC 36906), *K.thermotolerans* и *K.marxianus*; *yarrowia* (EP402226); *Pichia pastoris* (EP183070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP244234);
35 *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, такие как *Schwanniomyces occidentalis*; нитчатые грибы, такие как, например, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, и клетки-хозяева *Aspergillus*, такие как *A.nidulans* и *A.niger*.

Клетки-хозяева, подходящие для экспрессии, например, гликозилированного
40 CD20-связывающего антитела, происходят от многоклеточных организмов. Примерами клеток беспозвоночных являются клетки растений и насекомых. Были идентифицированы различные бакуловирусные штаммы и варианты, а также соответствующие перmissive клетки-хозяева насекомых, таких как *Spodoptera frugiperda* (гусеница совки), *Aedes aegypti* (желтолихорадочный комар), *Aedes albopictus*
45 (белопятнистый комар), *Drosophilamelanogaster* (плодовая мушка) и *Bombyx mori* (тутовый шелкопряд). В настоящее время имеется ряд доступных вирусных штаммов, которые могут быть использованы для трансфекции, например, вариант L-1 *Autographa californica* NPV и штамм Vm-5 *Bombyx mori* NPV, и такие вирусы могут быть
50 использованы в качестве вируса согласно изобретению, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

В качестве клеток-хозяев могут быть также использованы клетки растительных культур хлопчатника, кукурузы, картофеля, сои, петунии, томатов и табака.

Однако самый большой интерес представляют клетки позвоночных, и размножение клеток позвоночных в культуре (тканевой культуре) становится рутинной процедурой. Примерами обычно используемых линий клеток-хозяев млекопитающих являются клеточная линия CV1 почек обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); клеточная линия почек эмбриона человека (клетки 293 или клетки 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре [Graham et al., J. Gen. Virol. 36: 59 (1977)]; клетки почек детеныша хомячка (ВНК, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомячка/DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); клетки мышцы Сертоли (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); клетки почек обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почек африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почек собак (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени лабораторной крысы Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (HepG2, HB 8065); опухолевые клетки молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather et al., Annal N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); клетки MRC5; клетки FS4 и клеточная линия гепатомы человека (HepG2).

Клетки-хозяева трансформируют экспрессионными или клонирующими векторами для продуцирования антител, истощающих В-клетки, таких как CD20-связывающие антитела, или антител-антагонистов интегрина, и культивируют в подходящих питательных средах, модифицированных, если это необходимо, для индуцирования промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих нужные последовательности.

Культивирование клеток-хозяев

Клетки-хозяева, используемые для продуцирования антитела согласно изобретению, могут быть культивированы в различных средах. Средами, подходящими для культивирования клеток-хозяев, являются коммерчески доступные среды, такие как среда Хэмса F10 (Sigma), минимальная поддерживающая среда ((MEM)(Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и модифицированная по способу Дульбекко среда Игла (DMEM), Sigma). Кроме того, в качестве культуральной среды для культивирования клеток-хозяев может быть использована любая среда, описанная в публикации Nam et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), в патентах США № 4767704, 4657866, 4927762, 4560655 или 5122469; в WO 90103430; в WO 87/00195 или в патенте США Re.№ 30985. В любую из этих сред могут быть добавлены, если это необходимо, гормоны и/или другие факторы роста (такие как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), соли (такие как хлорид натрия и фосфат кальция и магния), буферы (такие как HEPES), нуклеотиды (такие как аденозин и тимидин), антибиотики (такие как лекарственное средство гентамицинTM), микроэлементы (определенные как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярных дозах), и глюкоза или эквивалентный источник энергии. Могут быть также включены любые другие необходимые добавки в соответствующих концентрациях, известные специалистам в данной области. Условиями культивирования, такими как температура, pH и т.п., являются условия, которые обычно используются для экспрессии выбранных клеток-хозяев и известны среднему специалисту в данной области.

Очистка антитела

С применением техники рекомбинантных ДНК, антитело может быть продуцировано внутри клеток или в периплазматическом пространстве, либо оно может быть непосредственно секретировано в среду. Если в первой стадии антитело

5 продуцируется внутри клеток, то затем клеточный дебрис или клетки-хозяева или их лизированные фрагменты удаляют, например, путем центрифугирования или ультрафильтрации. В публикации Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992) описана процедура выделения антител, которые секретируются в периплазматическое
 10 пространство *E.coli*. Вкратце, клеточную массу оттаивают в присутствии ацетата натрия (рН 3,5), EDTA и фенилметилсульфонилфторида (PMSF) в течение примерно 30 минут. Клеточный дебрис может быть удален путем центрифугирования. Если антитело секретируется в среду, то, обычно, сначала концентрируют супернатанты,
 15 полученные из таких экспрессионных систем, с использованием коммерчески доступного фильтра для концентрирования белков, например, устройства для ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. Для ингибирования протеолиза, в любой из предшествующих стадий может быть использован ингибитор протеазы, такой как PMSF, а для предупреждения размножения случайно вносимых примесных
 20 микроорганизмов могут быть использованы антибиотики.

Композиция антитела, полученная из клеток, может быть очищена, например, с помощью хроматографии на гидроксиапатитах, гель-электрофореза, диализа и
 25 аффинной хроматографии. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изоформа любого Fc-домена иммуноглобулина, присутствующего в данном антителе. Белок А может быть использован для очистки антител, содержащих тяжелые цепи $\gamma 1$, $\gamma 2$ или $\gamma 4$ иммуноглобулина человека (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). Для всех изоформ мыши и для цепи $\gamma 3$ человека рекомендуется
 30 использовать G-белок (Guss et al., EMBO J. 5:15671575 (1986)). В качестве матрицы, с которой связывается аффинный лиганд, наиболее часто применяется агароза, но могут быть использованы и другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с регулируемым размером пор или поли(стиролдивинил)бензол, позволяют
 35 достичь более высокой скорости потока и меньшей продолжительности времени обработки, чем это может быть достигнуто с использованием агарозы. Если антитело содержит домен C_H3, то для его очистки может быть использована смола Bakerbond ABXTM (J.T. Baker, Phillipsburg, N.J.). В зависимости от выделяемого антитела могут
 40 быть также применены и другие методы очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, преципитация этанолом, обращенно-фазовая ВЭЖХ, хроматография на двуокиси кремния, хроматография на гепарин-сефарозеTM, хроматография на анионо- или катионообменной смоле (например, на колонке с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, электрофорез в ДСН-ПААГ и преципитация сульфатом аммония.

После проведения любой(ых) предварительной(ых) стадии(й) очистки смесь, содержащая представляющее интерес антитело и примеси, может быть подвергнута гидрофобной хроматографии при низком рН с использованием элюирующего буфера
 45 при рН примерно 2,5-4,5, и предпочтительно, при низкой концентрации соли (например, примерно 0-0,25M).

Конъюгаты антител

Антитело может быть конъюгировано с цитотоксическим средством, таким как токсин или радиоактивный изотоп. В некоторых вариантах изобретения,
 50 предпочтительным токсином является калихеамицин, майтанзиноид, доластатин, ауристатин Е и их аналоги или производные.

Терапевтическое применение композиций антител

CD20-связывающие антитела согласно изобретению могут быть использованы для

лечения различных злокачественных и незлокачественных заболеваний, включая аутоиммунные заболевания и родственные состояния, и В-клеточных опухолей или злокачественных опухолей, характеризующихся экспрессией CD20 В-клетками, включая В-клеточные лимфомы и лейкозы. Стволовые клетки (предшественники В-клеток) костного мозга, в которых отсутствует антиген CD20, способствуют регенерации здоровых В-клеток и возвращению их нормального уровня после проведения лечения в течение нескольких месяцев.

Используемый здесь термин “аутоиммунное заболевание” означает заболевание или расстройство, вызываемое реакцией, продуцируемой организмом на свои собственные ткани и направленной против этих тканей, или их ко-сегрегацию или манифестацию или связанное с ними состояние. Примерами аутоиммунных заболеваний или расстройств являются, но не ограничиваются ими, артрит (ревматоидный артрит, юношеский ревматоидный артрит, остеоартрит, псориатический артрит и анкилозирующий спондилит), псориаз, дерматит, включая атопический дерматит; хроническая идиопатическая крапивница, включая хроническую аутоиммунную крапивницу, полимиозит/дерматомиозит, токсический эпидермальный некролиз, системную склеродермию и склероз; реакции, связанные с воспалительным заболеванием кишечника (ВЗК) (болезнь Крона, язвенный колит) и ВЗК с ко-сегрегирующей с гангренозной пиодермией, нодозной эритемой, первичным склерозирующим холангитом и/или эписклеритом), респираторный дистресс-синдром, включая респираторный дистресс-синдром взрослых (РДСВ); менингит; IgE-опосредуемые заболевания, такие как анафилактический шок и аллергический ринит; энцефалит, такой как энцефалит Расмуссена; увеит; колит, такой как микроскопический колит и коллагенозный колит; гломерулонефрит (ГН), такой как мембранозный ГН, идиопатический мембранозный ГН, мембранозный пролиферативный ГН (МПГН), включая ГН типа I и типа II, и быстро прогрессирующий ГН; аллергические состояния, экзема, астма, состояния, связанные с инфильтрацией Т-клеток, и с хроническими воспалительными ответами; атеросклероз; аутоиммунный миокардит; дефицит адгезии лейкоцитов; системная красная волчанка (СКВ), такая как кожная СКВ; волчанка (включая нефрит, церебрит, детскую волчанку, не-почечную волчанку, дискоидную волчанку, алопецию); юношеский диабет; рассеянный склероз (РС), такой как рассеянный склероз спинного мозга и зрительного нерва; аллергический энцефаломиелит, иммунные ответы, связанные с острой и замедленной гиперчувствительностью, опосредуемой цитокинами и Т-лимфоцитами; туберкулез; саркоидоз; гранулематоз, включая гранулематоз Вегенера, агранулоцитоз; васкулит (включая васкулит крупных кровеносных сосудов (включая ревматическую полимиалгию и гигантоклеточный артериит (Такаясу)), васкулит средних кровеносных сосудов (включая болезнь Кавазаки и узелковый полиартериит), васкулит ЦНС и ANCA-ассоциированный васкулит, такой как васкулит или синдром Черга-Штраусса (СЧШ); апластическая анемия; положительная анемия Кумбса; анемия Даймонда-Блекфана; иммунная гемолитическая анемия; включая аутоиммунную гемолитическую анемию (АИГА); пернициозная анемия; истинная эритроцитарная аплазия (ИЭА); дефицит фактора VIII; гемофилия А; аутоиммунная нейтропения; панцитопения; лейкопения; заболевания, приводящие к диapedезу лейкоцитов; воспалительные расстройства ЦНС; синдром поражения многих органов; тяжелая миастения; заболевания, опосредуемые образованием комплекса “антиген-антитело”; болезнь гломерулярных базальных мембран, катализируемая реакцией антитело-антиген; антифосфолипидный синдром;

аллергический нейрит; болезнь Бехчета; синдром Каслмана; синдром Гудпасчера; миастенический синдром Ламберта-Итона; синдром Рейно; синдром Сьегрена; синдром Стивенса-Джонсона; отторжение трансплантата твердого органа (включая предварительную обработку на высокие титры панели реактивных антител; 5 отложение IgA в тканях и отторжение трансплантата почки, печени, тонкой кишки, сердца и т.п.); реакция “трансплантат против хозяина” (GVHD); буллезный пемфигоид; пузырчатка (включая пузырчатку вульгарную, пузырчатку листовидную и пемфигоид слизистых оболочек - мембранозный пемфигоид); аутоиммунная 10 полиэндокринопатия; болезнь Райтера; синдром “негнущегося человека”; нефрит, связанный с иммунным комплексом; IgM-полиневропатия или IgM-опосредованная невропатия; идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТП); тромбоцитарная тромбоцитопеническая пурпура (ТПП); тромбоцитопения (например, развивающаяся у пациента с инфарктом миокарда), включая, аутоиммунную тромбоцитопению, 15 аутоиммунное заболевание яичек и яичника, включая аутоиммунный орхит и оофорит, первичный гипотиреозит, аутоиммунные эндокринные заболевания, включая аутоиммунный тиреоидит, хронический тиреоидит (тиреоидит Хашимото), подострый тиреоидит, идиопатический гипотиреозит; болезнь Адиссона; болезнь 20 Грейвса; аутоиммунные плюригландулярные синдромы (или плюригландулярные эндокринопатические синдромы); диабет типа I, также называемый инсулинзависимым сахарным диабетом (ИЗСД), включая детский ИЗСД и синдром Шихана; аутоиммунный гепатит; лимфоидный интерстициальный пневмонит (ЛИП); облитерирующий бронхиолит (не передающийся, в отличие от NSIP); синдром 25 Гийена-Барре; болезнь Бергера (IgA-нефропатия); первичный билиарный цирроз; кишечная спру (глутеновая энтеропатия), не поддающаяся лечению спру с ко-сегрегированным герпетиформным дерматитом; криоглобулинемия; амилоτροφический боковой склероз (АБС; болезнь Луи Герига); ишемическая болезнь 30 сердца; аутоиммунное заболевание внутреннего уха (АЗВУ); аутоиммунная потеря слуха; синдром пляшущих глаз (СПГ); полихондрит, такой как не поддающийся лечению полихондрит; легочный альвеолярный протеиноз; амилоидоз; гигантоклеточный гепатит; склерит; моноклональная гаммопатия 35 неопределенной/неясной этиологии, MGUS); периферическая невропатия; паранеопластический синдром; “каналопатии”, такие как эпилепсия, мигрень, аритмия, мышечные расстройства, глухота, слепота, периодический паралич и “каналопатии” ЦНС; аутизм, воспалительная миопатия и очаговый сегментарный гломерулосклероз (ОСГС).

40 В-клеточная опухоль или злокачественная опухоль, В-клетки которой экспрессируют CD20, представляет собой опухоль, характеризующуюся аномальной пролиферацией клеток, экспрессирующих CD20 на своей поверхности. В-клеточными 45 опухолями, имеющими CD20⁺-В-клетки, являются CD20-позитивная болезнь Ходжкина, включая, лимфоцитарную болезнь Ходжкина (ЛБХ); не-ходжкинская лимфома (НХЛ); фолликулярная центроклеточная (ФЦК) лимфома; острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ); хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ); ретикулоэндотелиоз. Не-ходжкинскими лимфомами являются 50 низкоклеточная/фолликулярная не-ходжкинская лимфома (НХЛ); мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома (МЛЛ); среднелюкачественная/фолликулярная НХЛ; среднелюкачественная диффузная НХЛ; высокозлокачественная иммунобластная НХЛ; высокозлокачественная лимфобластная НХЛ; высокозлокачественная мелкоклеточная

недифференцированная НХЛ; генерализованная НХЛ; плазмацитоидная лимфоцитарная лимфома; лимфома клеток коры головного мозга; лимфома, связанная со СПИД'ом; и макроглобулинемия Вальденстрема. Также рассматривается лечение рецидивов этих раковых заболеваний. ЛБХ представляет собой тип болезни Ходжкина, которая, несмотря на проводимую лучевую терапию или химиотерапию, имеет тенденцию к частым рецидивам и характеризуется присутствием CD20-позитивных злокачественных клеток. ХЛЛ представляет собой один из четырех основных типов лейкоза. Рак зрелых В-клеток, называемых лимфоцитами, а именно, ХЛЛ, характеризуется прогрессирующей аккумуляцией клеток крови, костного мозга и лимфатических тканей. Инертная лимфома представляет собой медленно развивающуюся неоперабельную опухоль, при которой средняя продолжительность жизни пациента, после ряда ремиссий и рецидивов, составляет от 6 до 10 лет.

Используемый здесь термин “не-ходжкинская лимфома” или “НХЛ” означает рак лимфатической системы, за исключением лимфомы Ходжкина. В общих чертах, лимфомы Ходжкина и не-ходжкинские лимфомы могут отличаться тем, что в лимфоме Ходжкина присутствуют клетки Рида-Штернберга, а в не-ходжкинской лимфоме, эти клетки отсутствуют. Примерами не-ходжкинских лимфом, охватываемых используемым здесь термином, являются все лимфомы, которые могут быть идентифицированы специалистом в данной области (например, онкологом или патологом) в соответствии с известными схемами классификации, такими как Пересмотренная Евро-Американская схема классификации лимфом (REAL), описанная в “Цветном атласе клинической гематологии” (3-е издание) (Color Atlas of Clinical Hematology (3rd edition), A. Victor Hoffbrand and John E. Pettit (eds.)(Harcourt Publishers Ltd., 2000). См., в частности, списки, представленные на фиг.11.57, 11.58 и 11.59. Более конкретными примерами таких лимфом являются, но не ограничиваются ими, рецидивирующая или не поддающаяся лечению НХЛ; пограничная низкоклеточная НХЛ первой линии; НХЛ на стадии III/IV; НХЛ, резистентная к химиотерапии; лимфобластный лейкоз и/или лимфома, содержащая В-клетки-предшественники; мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома; В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз и/или пролимфоцитарный лейкоз и/или мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома; В-клеточная пролимфоцитарная лимфома; иммуноцитома и/или лимфоплазматическая лимфома; лимфоплазматическая лимфома; В-клеточная лимфома маргинальной зоны; лимфома маргинальной зоны селезенки; лимфома экстранодальной маргинальной зоны - MALT; нодальная лимфома маргинальной зоны; ретикулоэндотелиоз; плазмацетома и/или плазмаклеточная миелома; низкоклеточная/фолликулярная лимфома; среднеклеточная/фолликулярная НХЛ; лимфома коры головного мозга; фолликулярно-центроцитарная лимфома (фолликулярная); среднеклеточная диффузная НХЛ; диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома; агрессивная НХЛ (включая агрессивную пограничную и агрессивную рецидивирующую НХЛ); НХЛ, рецидивирующая после трансплантации аутологичных стволовых клеток или резистентная к такой трансплантации; первичная медиастинальная крупноклеточная В-клеточная лимфома; первичная эффузионная лимфома; высококлеточная иммунобластная НХЛ; высококлеточная лимфобластная НХЛ; высококлеточная недифференцированная НХЛ; генерализованная НХЛ; лимфома Беркитта; лимфобластный лейкоз и/или лимфома, содержащая Т-клетки-предшественники (периферические); Т-клеточная лимфома и/или Т-клеточный лейкоз взрослых; Т-клеточный хронический лимфоцитарный

лейкоз и/или пролимфоцитарный лейкоз; крупноклеточный гранулярный лимфоцитарный лейкоз; грибовидный микоз и/или синдром Сезари; экстранодальная лимфома, содержащая природные клетки-киллеры/Т-клетки (назального типа); Т-клеточная лимфома энтеропатического типа; печеночно-селезеночная Т-клеточная лимфома; подкожная панникулит-подобная Т-клеточная лимфома; лимфома кожи (кожная лимфома); анапластическая крупноклеточная лимфома; ангиоцентрическая лимфома; Т-клеточная лимфома тонкого кишечника; периферическая Т-клеточная лимфома (если это не определено особо) и ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома.

В конкретных вариантах изобретения способы лечения В-клеточных раковых опухолей, содержащих CD20⁺-В-клеток согласно изобретению, применяются для лечения не-ходжкинской лимфомы (НХЛ), лимфоцитарной болезни Ходжкина (ЛБХ), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (МЛЛ), и хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ).

В конкретных вариантах изобретения, способы лечения аутоиммунного заболевания или заболевания, связанного с истощением В-клеток, применяются для лечения ревматоидного артрита и юношеского ревматоидного артрита, системной красной волчанки (СКВ), включая волчаночный нефрит, болезни Вегенера, воспалительного заболевания кишечника, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (ИТП), тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП), аутоиммунной тромбоцитопении, рассеянного склероза, псориаза, IgA-нефропатии, IgM-полиневропатии, тяжелой миастении, васкулита, сахарного диабета, синдрома Рейно, синдрома Сьегрена и гломерулонефрита.

Желательный уровень истощения В-клеток зависит от конкретного заболевания. Для лечения CD20-позитивного рака может оказаться желательным максимизировать истощение В-клеток, которые являются мишенями для анти-CD20 антител согласно изобретению. Так, например, для лечения CD20-позитивной В-клеточной опухоли может оказаться желательным, чтобы истощение В-клеток было достаточным по меньшей мере для предупреждения прогрессирования указанного заболевания, которое может быть оценено врачом-специалистом в данной области, например, путем мониторинга роста опухоли (размера), пролиферации раковых клеток, развития метастазов и появления других признаков и симптомов конкретного ракового заболевания. Предпочтительно, чтобы такое истощение В-клеток было достаточным для предупреждения прогрессирования заболевания по меньшей мере в течение 2 месяцев, более предпочтительно, в течение 3 месяцев, еще более предпочтительно, в течение 4 месяцев, еще более предпочтительно, в течение 5 месяцев, а наиболее предпочтительно, в течение 6 или более месяцев. В еще более предпочтительных вариантах, истощение В-клеток является достаточным для увеличения времени ремиссии по меньшей мере на 6 месяцев, более предпочтительно, на 9 месяцев, более предпочтительно, на 1 год, еще более предпочтительно, на 2 года, еще более предпочтительно, на 3 года, а наиболее предпочтительно, на 5 лет или более. В наиболее предпочтительном варианте изобретения, истощение В-клеток является достаточным для полного излечения заболевания. В предпочтительных вариантах изобретения, истощение В-клеток у раковых пациентов по меньшей мере примерно на 75%, а более предпочтительно, на 80%, 85%, 90%, 95%, 99% и даже на 100% превышает фоновый уровень до проведения лечения.

Для лечения аутоиммунного заболевания может оказаться желательным модулировать степень истощения В-клеток в зависимости от типа заболевания и/или

от тяжести состояния у индивидуума путем коррекции дозы CD20-связывающего антитела. Таким образом, истощение В-клеток может быть, но необязательно, полным. В некоторых случаях, полное истощение В-клеток может оказаться желательным в начале лечения, а на последующих стадиях лечения доза может быть соответствующим образом скорректирована для достижения лишь частичного истощения В-клеток. В одном из вариантов изобретения, истощение CD20-позитивных В-клеток составляет по меньшей мере 20%, т.е., 80% или менее, по сравнению с фоновым уровнем до проведения лечения. В других вариантах изобретения, истощение В-клеток составляет 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или более. Предпочтительно, чтобы истощение В-клеток было достаточным для прекращения прогрессирования указанного заболевания, более предпочтительно, для ослабления признаков и симптомов конкретного заболевания в процессе лечения, а наиболее предпочтительно, для полного излечения заболевания.

Параметры оценки эффективности или успешного лечения опухоли известны врачам-специалистам по данному заболеванию. В общих чертах, врач-специалист в данной области должен следить за ослаблением признаков и симптомов конкретного заболевания. Такими параметрами могут быть: средняя продолжительность периода времени до начала прогрессирования заболевания, время ремиссии и время стабильного состояния.

В нижеследующих работах описаны лимфомы и ХЛЛ, их диагностика, лечение и стандартные медицинские процедуры для определения эффективности лечения. См. Canellos G.P., Lister T.A., Sklar J.L.: *The Lymphomas*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1998; van Besien K & Cabanillas, F: *Clinical Manifestations, Staging and Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma*, Chap. 70 pp. 1293-1338: *Hematology, Basic Principles and Practice*, 3rd ed. Hoffman et al. (editors). Churchill Livingstone, Philadelphia, 2000 and Rai K. & Patel D: *Chronic Lymphocytic Leukemia*, Chap. 72, pp.1350-1362: *Hematology, Basic Principles and Practice*, 3rd ed., Hoffman et al. (editors). Churchill Livingstone, Philadelphia, 2000.

Параметры оценки эффективности или успешного лечения аутоиммунного заболевания или родственного ему заболевания известны врачам-специалистам по данному заболеванию. В общих чертах, врач-специалист в данной области должен следить за ослаблением признаков и симптомов конкретного заболевания. Ниже приводятся соответствующие примеры.

В одном из вариантов изобретения, способы и композиции согласно изобретению могут быть использованы для лечения ревматоидного артрита. РА характеризуется воспалением множества суставов, потерей хряща и эрозией кости, которая приводит к деструкции суставов, и, в конечном счете, к ухудшению функции суставов. Кроме того, поскольку РА является системным заболеванием, то он может оказывать воздействие и на ткани других органов, таких как легкие, глаза и костный мозг.

CD20-связывающие антитела могут быть использованы в качестве терапии первого ряда для пациентов с РА на ранней стадии (то есть, пациентов, которым не вводили метотрексат (MTX)), или в комбинации, например, с MTX или циклофосфамидом. Либо, эти антитела могут быть использованы в качестве терапевтических средств второго ряда для лечения пациентов, которые являются невосприимчивыми к DMARD и/или MTX, в комбинации, например, с MTX. CD20-связывающие антитела могут быть также введены в комбинации с агентами, мобилизующими В-клетки, такими как антитела против интегрина, которые способствуют миграции В-клеток в кровотоки и, тем самым, их более эффективному уничтожению. CD20-связывающие антитела могут

быть использованы для предупреждения и предотвращения поражения суставов, замедления структурного повреждения, уменьшения боли, связанной с воспалением при РА, и, в общих чертах, для ослабления признаков и симптомов умеренного или тяжелого РА. Пациент с РА может быть подвергнут лечению анти-CD20 антителом до или после лечения другими лекарственными средствами, обычно используемыми для лечения РА, или одновременно с таким лечением (см. ниже описание комбинированной терапии). В одном из вариантов изобретения, CD20-связывающее антитело вводят пациентам, которые оказались невосприимчивыми к ранее проводимому лечению противоревматическими средствами, влияющими на данное заболевание, и/или у которых наблюдался неадекватный ответ на введение лишь одного метотрексата. В другом варианте изобретения, пациентам вводят гуманизованное CD20-связывающее антитело плюс циклофосфамид, или CD20-связывающее антитело плюс метотрексат.

Один из методов оценки эффективности лечения РА основан на критериях, разработанных Американским колледжем ревматологов (ACR), которые позволяют измерять процент положительной динамики заболевания болезненных и опухших суставов, и т.п. Так, например, пациенту с РА, у которого, по сравнению с пациентом, не проходившим лечение антителом (например, по сравнению с его состоянием до лечения), или принимавшим плацебо, наблюдается 20%-ное улучшение, может быть дана оценка ACR20. Другими способами определения эффективности лечения антителом является рентгенографическое исследование, такое как рентгенографическая оценка по Шарпу, используемая для оценки структурного повреждения, такого как эрозия кости и сужение просвета между суставами. Пациенты могут быть также подвергнуты обследованию с точки зрения профилактики потери трудоспособности или улучшения трудоспособности с получением количественных показателей, определенных по опроснику состояния здоровья [HAQ], а также в результате AIMS-оценки и SF36-оценки, проводимых во время или после лечения. Критерий ACR 20 может означать 20% снижение числа хрупких (болезненных) и опухших суставов плюс 20% улучшение по меньшей мере по 3 из 5 дополнительных признаков:

1. Самооценка пациентом боли по визуальной аналоговой шкале (VAS),
2. Самооценка пациентом общего состояния здоровья (VAS),
3. Оценка лечащим врачом общего состояния здоровья (VAS),
4. Самооценка пациентом потери своей трудоспособности, определенной по опроснику о состоянии здоровья, и
5. Реагенты острой фазы, CRP или ESR.

Аналогичным образом могут быть определены ACR 50 и 70. Пациенту, предпочтительно, вводят CD20-связывающее антитело согласно изобретению в количестве, эффективном для достижения оценки ACR20, предпочтительно по меньшей мере ACR30, более предпочтительно по меньшей мере ACR50, еще более предпочтительно по меньшей мере ACR70, а наиболее предпочтительно по меньшей мере ACR75 и выше.

Псориатический артрит имеет уникальные и различные рентгенографические признаки. При псориатическом артрите, эрозия суставов и сужение просвета между суставами могут быть также оценены по методу Шарпа. Описанные здесь гуманизованное CD20-связывающие антитела могут быть использованы для предупреждения поражения суставов, а также для ослабления патологических признаков и симптомов указанного расстройства.

В еще одном своем аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения волчанки или СКВ путем введения пациенту, страдающему СКВ, терапевтически эффективного количества гуманизированного CD20-связывающего антитела согласно изобретению. Оценки SLEDAI позволяют количественно оценивать активность заболевания. SLEDAI представляет собой весовой коэффициент 24 клинических и лабораторных параметров, которые коррелируют с активностью заболевания, при этом, диапазон числовых значений этого коэффициента составляет 0-103. См. Bryan Gescuk & John Davis, "Novel therapeutic agent for systemic lupus erythematosus", Current Opinion in Rheumatology 2002, 14:515-521. Очевидно, что антитела против двухцепочечной ДНК вызывают воспалительные реакции в почках и другие манифестации волчанки. Пациенты, проходящие лечение антителами, могут наблюдаться в течение периода времени до появления обострения почечного заболевания, которое определяют как значимое воспроизводимое увеличение креатинина в сыворотке, белка в моче или крови в моче. Альтернативно или дополнительно, пациенты могут быть подвергнуты мониторингу на уровни антиядерных антител и антител против двухцепочечной ДНК. Лечение СКВ включает введение высоких доз кортикостероидов и/или циклофосфида (HDCC).

Спондилоартропатии представляют собой группу заболеваний суставов, включая анкилозирующий спондилит, псориатический артрит и болезнь Крона. Эффективность лечения может быть подтверждена самим пациентом, а также врачом с помощью различных средств, применяемых для оценки общего состояния здоровья пациента.

Для лечения псориаза применяются различные лекарственные средства, и такое лечение непосредственно зависит от тяжести заболевания. Пациентам с более мягкой формой псориаза обычно проводят местное лечение такими средствами, как стероиды для местного применения, антралин, кальципотриен, клобетазол и тазаротен, а для пациентов с умеренной и тяжелой формой псориаза, более подходящим лечением является системная терапия (с использованием метотрексата, ретиноидов, циклоспорина, PUVA и UVB). Могут быть также использованы дегтярные смолы. Такая терапия связана с проблемами безопасности, с необходимостью проведения длительного курса лечения или процедур, причиняющих неудобство пациенту. Кроме того, некоторые способы лечения требуют применения дорогостоящего оборудования и специального помещения в амбулаторных учреждениях. Лекарственные средства для системного лечения могут давать серьезные побочные эффекты, включая гипертензию, гиперлипидемию, подавление функции костного мозга, заболевание печени, заболевание почек и расстройство желудочно-кишечного тракта. Кроме того, применение фототерапии может приводить к увеличению заболеваемости раком кожи. Помимо неудобства и дискомфорта, связанного с применением местного лечения, фототерапии и системного лечения, пациенту требуется проведение курсов терапии и мониторинга продолжительности облучения, связанного с побочными эффектами.

Эффективность лечения псориаза оценивают путем проведения мониторинга изменения клинических признаков и симптомов заболевания, включая оценку врачом общего состояния здоровья пациента (PGA), оценку площади поражения псориазом и показатель тяжести заболевания (PASI), и оценку симптомов псориаза (PSA), по сравнению с состоянием пациента до лечения. Оценка состояния пациента может быть проведена периодически самим пациентом во время его лечения по визуальной аналоговой шкале, используемой для определения степени зуда, наблюдаемого в конкретные периоды времени.

Анти-HER2 антитела, имеющие Fc-мутации согласно изобретению, могут быть

использованы для лечения раковой опухоли, которая экспрессирует или сверхэкспрессирует HER2. “HER2-экспрессирующей раковой опухолью” является опухоль, содержащая клетки, имеющие на своей поверхности белок HER2. Раковой опухолью, которая “сверхэкспрессирует” рецептор HER, является опухоль на клеточной поверхности, в которой наблюдаются значительно более высокие уровни рецептора HER, такого как HER2, по сравнению с не-раковыми клетками тканей того же типа. Такая сверхэкспрессия может возникать вследствие амплификации гена или повышения уровня его транскрипции или трансляции. Сверхэкспрессия рецептора HER может быть определена в диагностическом или прогностическом анализе путем оценки повышения уровней белка HER, присутствующего на поверхности клеток (например, с помощью иммуногистохимического анализа; ИГХ). Альтернативно или дополнительно, могут быть измерены уровни HER-кодирующей нуклеиновой кислоты в клетках, например, посредством флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH; см. заявку WO 98/45479, опубликованную в октябре 1998), Саузерн-блот-анализа или с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), такой как количественная ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР). Сверхэкспрессия рецептора HER может быть также исследована путем определения уровня “слущивания” антигена (например, внеклеточного домена HER) в биологической жидкости, такой как сыворотка (см. например, патент США № 4933294, выданный 12 июня 1990; заявку WO91/05264, опубликованную 18 апреля 1991; патент США № 5401638, выданный 28 марта, 1995, и публикацию Sias et al., J. Immunol. Methods 132:73-80 (1990)). Помимо вышеописанных анализов, специалистом в данной области могут быть проведены различные анализы *in vivo*. Так, например, клетки в организме пациента могут быть обработаны антителом, которое может быть, но необязательно, помечены детектируемой меткой, например, радиоактивным изотопом, а связывание антитела с клетками пациента может быть оценено, например, путем внешнего сканирования на радиоактивность или путем анализа биоптата, взятого у пациента, предварительно обработанного указанным антителом.

Различные раковые заболевания, которые могут быть подвергнуты лечению композициями антител против Her-2, перечислены ниже.

Термины “рак” и “раковый” означают или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется нарушением регуляции клеточного роста. Примерами рака являются, но не ограничиваются ими, карцинома, лимфома, бластома (включая медуллобластому и ретинобластому), саркома (включая липосаркому и саркому синовиальных клеток), нейроэндокринные опухоли (включая карциноидные опухоли, гастриному и раковую опухоль клеток панкреатических островков), мезотелиома, шваннома (включая невриному слухового нерва), менингиома, аденокарцинома, меланома и лейкоз или лимфоидные злокачественные опухоли. Более конкретными примерами таких раковых опухолей являются плоскоклеточный рак (например, эпителиальный плоскоклеточный рак), рак легких, включая мелкоклеточный рак легких, не-мелкоклеточный рак легких, аденокарциному легких и плоскоклеточную карциному легких, рак брюшной полости, гепатоцеллюлярный рак, рак кишечника или желудка, включая рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластома, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатома, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак ободочной кишки, карцинома эндометрия или матки, карцинома слюнной железы, рак почек, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, гепатокарцинома, карцинома заднего

прохода, карцинома пениса, рак яичек, рак пищевода, опухоли желчных путей, а также рак головы и шеи.

Также считается, что анти-HER2 антитело может быть использовано для лечения различных незлокачественных заболеваний или расстройств, таких как аутоиммунное заболевание (например, псориаз); эндометриоз; склеродермия; рестеноз; полипы, такие как полипы толстой кишки, полипы носа или полипы желудочно-кишечного тракта; фиброаденома; респираторное заболевание; холецистит; нейрофиброматоз; поликистоз почек; воспалительные заболевания; кожные болезни, включая псориаз и дерматит; сосудистое заболевание; состояния, характеризующиеся аномальной пролиферацией сосудистых эпителиальных клеток; язвы желудочно-кишечного тракта; болезнь Менетрие; секреторные аденомы или синдром потери белка; почечные расстройства; ангиогенные расстройства; глазные болезни, такие как возрастная дегенерация желтого пятна, синдром потенциального гистоплазмоза глаз, неоваскуляризация сетчатки в результате пролиферативной диабетической ретинопатии, васкуляризация сетчатки, диабетическая ретинопатия, или возрастная дегенерация желтого пятна; патологии костей, такие как остеоартрит, рахит и остеопороз; повреждения после приступа ишемии головного мозга; заболевания, связанные с фиброзом или отеками, такие как цирроз печени, фиброз легких, саркоидоз, тиреоидит, синдром системной повышенной вязкости крови, болезнь Ослера-Вебера-Рандю, хроническое окклюзионное пражение легких, или отеки после ожогов, травм, облучения, инсульта, гипоксии или ишемии; кожные реакции гиперчувствительности; диабетическая ретинопатия и диабетическая нефропатия; синдром Гийена-Барре; реакция “трансплантат против хозяина” или отторжение трансплантата; болезнь Пэджета; воспаление костей или суставов; старение кожи под действием светового излучения (например, вызываемое УФ-облучением кожи человека); доброкачественная гипертрофия предстательной железы; некоторые микробные инфекции, включая микробные патогены, выбранные из аденовирусов, хантавирусов, *Borrelia burgdorferi*, *Yersinia* spp. и *Bordetella pertussis*; тромбоз, вызванный агрегацией тромбоцитов; заболевания репродуктивных органов, такие как эндометриоз, синдром гиперстимуляции яичника, преэклампсия, дисфункциональные маточные кровотечения или менометроррагия; синовит; атерома; острая и хроническая нефропатии (включая пролиферативный гломерулонефрит и индуцированное диабетом почечное заболевание); экзема; образование гипертрофированных рубцов; эндотоксический шок и грибковая инфекция; наследственный аденоматозный полипоз; нейродегенеративные заболевания (например, болезнь Альцгеймера, деменция, связанная со СПИД'ом, болезнь Паркинсона, амиотрофический боковой склероз, пигментоз сетчатки, атрофия мышц позвоночника и дегенерация мозжечка); миелодиспластические синдромы; апластическая анемия; ишемическое поражение; фиброз легких, почек или печени; Т-клеточно-опосредуемая гиперчувствительность; гипертрофическое сужение привратника на ранней стадии; синдром обструкции мочевых путей; псориатический артрит; и тиреоидит Хашимото. Предпочтительными не-злокачественными заболеваниями, имеющими показания к рассматриваемой здесь терапии являются псориаз, эндометриоз, склеродермия, сосудистое заболевание (например, рестеноз, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца или гипертензия), полипы толстой кишки, фиброаденома или респираторное заболевание (например, астма, хронический бронхит, бронхоэктаз или кистозный фиброз).

Антиангиогенные антитела и анти-VEGF антитела согласно изобретению могут

5 быть использованы для лечения расстройств, связанных с ангиогенезом, которые
 включают нижеследующие опухолевые и не-опухолевые заболевания. Опухолевыми
 заболеваниями являются, но не ограничиваются ими, карцинома, лимфома, бластома,
 саркома и лейкоз или лимфоидные злокачественные опухоли. Более конкретными
 10 примерами таких раковых заболеваний являются рак почек, рак молочной железы,
 рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак ободочной кишки, рак легких, включая
 мелкоклеточный рак легких, не-мелкоклеточный рак легких, аденокарциному легких и
 плоскоклеточную карциному легких; плоскоклеточный рак (например,
 15 плоскоклеточный эпителиальный рак), рак шейки матки, рак яичника, рак
 предстательной железы, рак печени, рак мочевого пузыря, рак брюшины,
 гепатоцеллюлярный рак, рак кишечника или желудка, включая рак
 желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, рак головы и шеи,
 20 глиобластома, ретинобластома, астроциты, текомы, арренобластомы, гепатома,
 злокачественные заболевания кроветворной системы, включая не-ходжкинскую
 лимфому (НХЛ), множественную миелому и острые злокачественные заболевания
 кроветворной системы; карцинома эндометрия или матки, эндометриоз,
 фибросакромы, хориокарцинома, карцинома слюнных желез, рак вульвы, рак
 25 щитовидной железы, карциномы пищевода, карцинома печени, карцинома заднего
 прохода, карцинома пениса, карцинома носоглотки, карцинома горла, саркома
 Капоши, меланома, саркомы кожи, шваннома, олигодендроглиома, нейробластома,
 рабдомиосаркома, остеогенная саркома, лейомиосаркома, карцинома мочевых путей,
 карцинома щитовидной железы, опухоль Вильмса, а также аномальная пролиферация
 30 сосудов, связанная с факатозами, отеки (такие как отеки, связанные с опухолями
 головного мозга), и синдром Мейжа. Более конкретно, раковыми заболеваниями,
 поддающимися лечению антагонистами согласно изобретению, являются рак почек,
 рак молочной железы, рак ободочной кишки, не-мелкоклеточный рак легких,
 не-ходжкинская лимфома (НХЛ), рак предстательной железы, рак печени, рак головы
 и шеи, меланома, рак яичника, мезотелиома и множественная миелома.

Не-опухолевыми заболеваниями, поддающимися лечению антиангиогенными
 антителами, включая анти-VEGF антитела, являются, но не ограничиваются ими,
 35 нежелательная или aberrantная гипертрофия, артрит, ревматоидный артрит (РА),
 псориаз, псориазические бляшки, саркоидоз, атеросклероз, атеросклеротические
 бляшки, отек в результате инфаркта миокарда, диабетические и другие
 пролиферативные ретинопатии, включая ретинопатию недоношенных,
 ретролентальную фиброплазию, неоваскулярную глаукому, возрастную дегенерацию
 40 желтого пятна, диабетический отек желтого пятна, неоваскуляризацию роговицы,
 неоваскуляризацию трансплантата роговицы, отторжение трансплантата роговицы,
 неоваскуляризацию сетчатки/хороидальной оболочки, неоваскуляризацию угла
 глазного блока (покраснение глаза), неоваскулярное заболевание глаз; рестеноз
 сосудов; артериовенозная мальформация (АВМ); менигиома; гемангиома;
 45 ангиофиброма; гиперплазия щитовидной железы (включая болезнь Грейвса);
 трансплантация роговицы глаза и других тканей; хроническое воспаление; воспаление
 легких; острое поражение легких/респираторный дистресс-синдром взрослых (РДСВ);
 сепсис; первичная легочная гипертензия; злокачественные экссудаты в области легких;
 50 отек головного мозга (например, связанных с инсультом/закрытым
 повреждением/травмой головы); синовит; образование паннуса при РА;
 оссифицирующий миозит; гипертрофия костей; остеоартрит (ОА); не поддающийся
 лечению асцит; поликистоз яичника; эндометриоз; заболевания, связанные с

секвестрацией жидкости в третьем пространстве [в полости полых органов] (панкреатит, туннельный синдром, ожоги, заболевание кишечника); фиброма матки; преждевременные роды; хроническое воспаление, такое как ВЗК (болезнь Крона и язвенный колит); отторжение почечного аллотрансплантата; воспалительное
5 заболевание кишечника; нефротический синдром; нежелательный или aberrантный рост тканевой массы (не-раковых тканей); гемофилическая артропатия; гипертрофированные рубцы; подавление роста волос; синдром Ослера-Вебера; пиогенная гранулема; ретролентальная фиброплазия; склеродермия; трахома,
10 васкулярная адгезия; синовит; дерматит; преэклампсия; асциты; выпоты в область перикарда (например, связанные с перикардитом) и плевральные выпоты.

Анти-CD11a антитела, имеющие аминокислотные модификации в Fc согласно изобретению, могут быть использованы для лечения LFA-1-опосредуемых
15 заболеваний. Термин “LFA-1-опосредуемые заболевания” означает патологические состояния, вызываемые клеточно-адгезивными взаимодействиями с рецептором LFA-1 на лимфоцитах. Примерами таких заболеваний являются Т-клеточные воспалительные ответы, такие как воспалительные заболевания кожи, включая псориаз; ответы, связанные с воспалительным заболеванием кишечника (таким как болезнь Крона и язвенный колит); респираторный дистресс-синдром взрослых; дерматит; менингит;
20 энцефалит; увеит; аллергические состояния, такие как экзема и астма, и другие состояния, связанные с инфильтрацией Т-клеток, и хронические воспалительные ответы; реакции гиперчувствительности кожи (включая контакт с ядовитым плющом и ядовитым дубом); атеросклероз; дефицит адгезии лейкоцитов; аутоиммунные
25 заболевания, такие как ревматоидный артрит, системная красная волчанка (СКВ), сахарный диабет, рассеянный склероз, синдром Рейно, аутоиммунный тиреоидит, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, синдром Сьегрена, юношеский диабет и иммунные ответы, связанные с замедленной гиперчувствительностью,
30 опосредуемой цитокинами и Т-лимфоцитами, обычно обнаруживаемыми при туберкулезе, саркоидозе, полимиозите, гранулематозе и васкулитах; пернициозная анемия; заболевания, связанные с диapedезом лейкоцитов; воспалительное
заболевание ЦНС; синдром поражения многих органов в результате сепсиса или травмы; аутоиммунная гемолитическая анемия; тяжелая миастения; заболевания,
35 опосредуемые комплексом “антиген-антитело”; отторжение трансплантата всех типов, включая реакцию “трансплантат против хозяина” или “хозяин против трансплантата”.

Анти-IgE антитела, имеющие аминокислотные модификации в Fc согласно изобретению, которые приводят к повышению уровня связывания с FcRn и
40 увеличению времени полужизни в сыворотке, могут быть использованы для лечения IgE-опосредуемых заболеваний.

IgE-опосредуемые заболевания включают atopические заболевания, характеризующиеся врожденной предрасположенностью к иммунному ответу на
45 множество широко распространенных природных вдыхаемых и проглатываемых антигенов и к непрерывному продуцированию антител IgE. Конкретными atopическими заболеваниями являются аллергическая астма, аллергический ринит, atopический дерматит и аллергическая гастроэнтеропатия. У пациентов с
50 atopическими заболеваниями часто возникают различные аллергии, а это означает, что у них вырабатываются антитела IgE ко многим аллергенам окружающей среды, включая сезонные, постоянные и профессиональные аллергены, и в результате, возникают соответствующие симптомы. Примерами сезонных аллергенов являются

пыльца (например, травы, деревьев, ржи, тимopheевки, амброзии), а примерами постоянных аллергенов являются грибки (например, плесень, плесневые споры), перья, продукты жизнедеятельности животных и насекомых (например, клещей домашней пыли). Примерами профессиональных аллергенов являются детергенты, металлы и изоцианаты. Не-антигенными специфическими раздражителями, которые могут вызывать IgE-опосредуемую реакцию, являются инфекционные агенты, раздражающие факторы, такие как дымовые газы, газы, образующиеся после сгорания топлива, частицы выхлопных газов дизельного топлива и диоксида серы, физическая нагрузка, холодовые факторы и эмоциональный стресс. Реакции гиперчувствительности могут возникать в результате воздействия пищевых белков, яда, вакцин, гормонов, антисыворотки, ферментов и латекса, а также антибиотиков, мышечных релаксантов, витаминов, цитотоксинов, опиатов и полисахаридов, таких как декстрин, комплекса “железо-декстран” и полигелин.

Однако заболеваниями, связанными с повышенными уровнями IgE, являются, но не ограничиваются ими, наследственные (атопические) заболевания. Другими заболеваниями, связанными с повышенными уровнями IgE, которые, очевидно, опосредуются IgE и поддаются лечению композициями согласно изобретению, являются гиперчувствительность (например, анафилактическая гиперчувствительность), экзема, крапивница, аллергический бронхопульмонарный аспергиллез, паразитарные болезни, синдром сверхэкспрессии IgE, атаксия-телангиэктазия, синдром Вискотта-Алдрича, синдром Черга-Штраусса, системный васкулит, алимфоплазия тимуса, IgE-экспрессирующая миелома, реакция “трансплантат против хозяина”, воспалительное заболевание кишечника (например, болезнь Крона, язвенный колит, колит неясной этиологии и инфекционный колит), гастроэнтеропатия, энтерит, мукозит (например, мукозит ротовой полости, мукозит желудочно-кишечного тракта, мукозит носа и проктит), некротирующий энтероколит и эзофагит.

Дозы

В зависимости от заболевания, подвергаемого лечению, и факторов, которые влияют на выбор дозы, и которые должны быть известны врачу-специалисту в данной области, антагонисты и антитела согласно изобретению могут быть введены в дозе, эффективной для лечения такого заболевания и обладающей минимальным токсическим действием и минимальными побочными эффектами. Для лечения CD20-позитивного рака или аутоиммунного заболевания, терапевтически эффективная доза составляет примерно от 250 мг/м² до 400 мг/м² или 500 мг/м², а предпочтительно, примерно 250-375 мг/м². В одном из вариантов изобретения, указанная доза составляет 275-375 мг/м². В одном из вариантов лечения CD20-позитивной В-клеточной опухоли, антитело вводят в дозе, составляющей 300-375 мг/м². В конкретном варианте изобретения, для лечения пациентов, страдающих В-клеточной лимфомой, такой как не-ходжкинская лимфома, анти-CD20 антитела и гуманизованные анти-CD20 антитела согласно изобретению вводят человеку-пациенту в дозе 10 мг/кг или 375 мг/м². В одном из вариантов изобретения, ритуксимаб может быть введен в дозе 7-15 мг/кг. Для лечения НХЛ, одна из схем введения доз может предусматривать введение одной дозы композиции антител, составляющей 10 мг/кг в первую неделю лечения, а затем после 2-недельного перерыва, введение второй дозы антитела в том же количестве. В общих чертах, пациенты с НХЛ проходят такой курс лечения один раз в год, но при возникновении рецидивов лимфомы, такое лечение может быть проведено повторно. В другой схеме введения доз, пациентам с

низкокачественной НХЛ в течение четырех недель вводят вариант гуманизованного 2Н7, а предпочтительно, v16 (375 мг/м², еженедельно), а затем, через 5 недель проводят три дополнительных курса лечения антителом плюс стандартную химиотерапию СНОР (циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном) или СVP (циклофосфамидом, винкристином и преднизолоном), которую проводят каждые три недели за три цикла.

В одном из вариантов изобретения, для лечения ревматоидного артрита вводят две дозы гуманизованного антитела в количестве от 125 мг/м² (эквивалентном примерно 200 мг/дозу) до 600 мг/м², например, первую дозу 200 мг вводят в первый день, а вторую дозу 200 мг вводят на 15-й день. В других вариантах изобретения, указанные дозы составляют 250 мг, 275 мг, 300 мг, 325 мг, 350 мг, 375 мг, 400 мг, 425 мг, 450 мг, 475 мг, 500 мг, 525 мг, 550 мг, 575 мг, 600 мг/дозу.

Для лечения заболевания, антитела против В-клеток-мишеней, такие как CD20-связывающие антитела согласно изобретению, могут быть введены пациенту непрерывно или периодически, как может быть определено лечащим врачом-специалистом.

У пациента, которому лекарственное средство вводят путем внутривенного вливания или подкожно, могут наблюдаться побочные эффекты, такие как повышение температуры, озноб, чувство жжения, астения и головная боль. Для ослабления или минимизации таких побочных эффектов, пациенту может(могут) быть сначала введена(ы) первоначальная(ые) обычная(ые) доза(ы) антитела, а затем терапевтическая доза. Для выработки у пациента толерантности к более высоким дозам, обычная(ые) доза(ы) должна(ы) быть ниже терапевтической дозы.

Способ введения

Антитела, используемые в способах согласно изобретению, вводят человеку методами, известными практически врачам, такими как внутривенное введение, например, введение ударной дозы или непрерывное вливание в течение определенного периода времени, подкожное, внутримышечное, внутриартериальное, внутрибрюшинное, внутрилегочное, интрацереброспинальное, внутрисуставное, интрасиновиальное и интратекальное введение, а также введение в пораженный участок или ингаляция (например, интраназальная), а в основном, внутривенное или подкожное введение.

В одном из вариантов изобретения, гуманизованное антитело 2Н7 вводят путем внутривенного вливания с 0,9% раствора хлорида натрия в качестве инфузионного носителя.

Комбинированная терапия

Для лечения В-клеточных опухолей, описанных выше, пациенту могут быть введены CD20-связывающие антитела согласно изобретению в комбинации с одним или несколькими терапевтическими средствами, такими как химиотерапевтическое средство, в соответствии со схемой введения множества лекарственных средств. CD20-связывающее антитело может быть введено одновременно, последовательно или поочередно с химиотерапевтическим средством, либо после другой терапии, к которой данный пациент оказался невосприимчивым. Стандартными химиотерапевтическими средствами для лечения лимфомы могут быть циклофосфамид, цитарабин, мелфалан и митоксантрон плюс мелфалан. Одной из наиболее часто применяемых химиотерапевтических схем лечения не-ходжкинской лимфомы является СНОР. Лекарственными средствами, используемыми в схеме СНОР, являются: циклофосфамид (торговый знак "цитоксан", неозар); адриамицин

(доксорубин/гидроксидоксорубин); винкристин (онковин); и преднизолон (иногда называемый дельтазоном или оразоном). В конкретных вариантах изобретения, CD20-связывающее антитело вводят пациенту, нуждающемуся в этом, в комбинации с одним или несколькими нижеследующими химиотерапевтическими средствами, такими как доксорубин, циклофосфамид, винкристин и преднизолон. В конкретном варианте изобретения, пациента, страдающего лимфомой (такой как не-ходжкинская лимфома), подвергают лечению анти-CD20 антителом согласно изобретению в комбинации с терапией СНОР (циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном). В другом варианте изобретения, пациент, страдающий раком, может быть подвергнут лечению гуманизованным CD20-связывающим антителом согласно изобретению в комбинации с химиотерапией СVP (циклофосфамидом, винкристином и преднизолоном). В конкретном варианте изобретения, пациента, страдающего CD20-позитивной НХЛ, подвергают лечению гуманизованным 2H7.v16 или его вариантом, описанным выше, в комбинации с СVP. В конкретном варианте лечения ХЛЛ, CD20-связывающее антитело вводят в комбинации с химиотерапией, включающей одно из таких средств, как флударабин и цитоксан, или оба эти средства.

Для лечения аутоиммунных заболеваний или аутоиммунных родственных состояний, описанных выше, пациент может быть подвергнут лечению средством, истощающим В-клетки, таким как CD20-связывающие антитела согласно изобретению в комбинации со вторым терапевтическим средством, таким как иммунодепрессант, в соответствии со схемой введения множества лекарственных средств. Указанное средство, истощающее В-клетки, может быть введено одновременно, последовательно или поочередно с иммунодепрессантом, либо после другой терапии, к которой данный пациент оказался невосприимчивым. Иммунодепрессант может быть введен в обычно используемых дозах или в меньших дозах. Выбор предпочтительного вспомогательного иммунодепрессанта зависит от многих факторов, включая тип заболевания, подвергаемого лечению, а также историю болезни пациента.

Термин “иммунодепрессант”, используемый здесь для проведения вспомогательной терапии, означает средство, которое подавляет или маскирует иммунную систему пациента. Такие средства должны включать вещества, которые подавляют продуцирование цитокинов, ингибируют или подавляют экспрессию аутоантигена, или маскируют антигены МНС. Примерами таких средств являются стероиды, такие как глюкокортикостероиды, например, преднизон, метилпреднизолон и дексаметазон; 2-амино-6-арил-5-замещенные пиримидины (см. патент США № 4665077), азатиоприн (или циклофосфамид, в том случае, если наблюдается побочная реакция на азатиоприн); бромкриптин; глутаральдегид (маскирующий антигены МНС, как описано в патенте США № 4120649); антиидиотипические антитела против антигенов МНС и фрагментов МНС; циклоспорин А; антагонисты цитокина или рецептора цитокина, включая антитела против интерферона- γ , β или α ; антитела против фактора некроза опухоли- α ; антитела против фактора некроза опухоли- β ; антитела против интерлейкина-2 и антитела против рецептора IL-2; антитела против L3T4; гетерологичное антитело против лимфоцитарного глобулина; пан-Т-антитела, а предпочтительно, анти-CD3 или анти-CD4/CD4a антител; растворимый пептид, содержащий LFA-3-связывающий домен (заявка WO 90/08187, опубликованная 7/26/90); стрептокиназа; TGF- β ; стрептодорназа; РНК или ДНК хозяина; FK506; RS-61443; дезоксиспергуалин; рапамицин; Т-клеточный рецептор (патент США № 5114721); фрагменты Т-клеточного рецептора (Offner et al., Science 251:430-432 (1991); WO 90/11294 и WO 91/01133) и антитела против Т-клеточного

рецептора (EP 340109), такие как T10B9.

Для лечения ревматоидного артрита пациенту может быть введено анти-CD20 антитело согласно изобретению в комбинации с одним или несколькими
 5 нижеследующими средствами, такими как: DMARDS (модифицирующие заболевание противоревматические лекарственные средства, например, метотрексат), NSAИ
 или NSAID (нестероидные противовоспалительные лекарственные средства), HUMIRATM (адалимумаб; Abbott Laboratories), ARAVA® (лефлуномид), REMICADE®
 10 (инфликсимаб; Centocor Inc., of Malvern, Pa), ENBREL (этанерцепт; Immunex, WA) и ингибиторы COX-2. Лекарственными средствами DMARD, обычно используемыми для лечения РА, являются гидроксихлорохин, сульфасаазин, метотрексат, лефлуномид, этанерцепт, инфликсимаб, азатиоприн, D-пеницилламин, золото (для перорального введения), золото (для внутримышечного введения), миноциклин, циклоспорин и
 15 иммуноадсорбирующий стафилококковый белок А. Адалимумаб представляет собой моноклональное антитело человека, связывающееся с TNF-α. Инфликсимаб представляет собой химерное моноклональное антитело, связывающееся с TNF-α. Этанерцепт представляет собой гибридный белок “иммуноадгезин”, состоящий из внеклеточной лиганд-связывающей части рецептора человека фактора некроза
 20 опухоли размером 75 кД (p75)(TNFR), связанной с Fc-частью IgG1 человека. Описание лечения РА можно найти, например, в руководстве “Guidelines for the management of rheumatoid arthritis” *Arthritis & Rheumatism* 46(2):328-346 (February, 2002). В конкретном варианте изобретения, пациент, страдающий РА, может быть подвергнут лечению
 25 анти-CD20 антителом согласно изобретению в комбинации с метотрексатом (MTX). Репрезентативная доза MTX составляет примерно 7,5-25 мг/кг/неделю. MTX может быть введен перорально и подкожно.

Для лечения анкилозирующего спондилита, псориатического артрита и болезни Крона пациенту может быть введено CD20-связывающее антитело согласно
 30 изобретению в комбинации, например, со средством Remicade® (инфликсимабом, поставляемым Centocor Inc., of Malvern, Pa) и ENBREL (этанерцептом; Immunex, WA).

Для лечения СКВ вводят высокие дозы кортикостероидов и/или циклофосфида (HDCC).

Для лечения псориаза пациенту может быть введено CD20-связывающее антитело в
 35 сочетании с местной терапией лекарственными средствами, такими как стероиды для местного применения, антралин, кальципотриен, клобетазол и тазаротен, или в сочетании с терапией метотрексатом, ретиноидами, циклоспорином, PUVA и UVB. В одном из вариантов изобретения пациент с псориазом может быть подвергнут
 40 лечению CD20-связывающим антителом с последовательным или одновременным введением циклоспоринона.

Фармацевтические композиции

Терапевтические композиции антител, используемых в соответствии с настоящим изобретением, получают в виде препаратов, удобных для хранения, путем смешивания
 45 антитела, имеющего нужную степень чистоты, с необязательными физиологически приемлемыми носителями, наполнителями или стабилизаторами (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), в форме лиофилизированных композиций или водных растворов. Приемлемые носители, наполнители или
 50 стабилизаторы в используемых дозах и концентрациях должны быть нетоксичными для реципиентов, и ими являются буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид

гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензэтония; фенолоспирт, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные полипептиды (имеющие примерно менее, чем 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; металлокомплексы (например, комплексы Zn - белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как твинTM, плуроникTM или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Репрезентативные композиции анти-CD20 антител описаны в заявке WO 98/56418, точное содержание которой вводится в настоящую заявку посредством ссылки. Другой композицией является жидкая мультидозовая композиция, содержащая 40 мг/мл анти-CD20 антитела, 25 мМ ацетата, 150 мМ трегалозы, 0,9% бензилового спирта, 0,02% полисорбата 20 при pH 5,0, и имеющая минимальный срок хранения 2 года при 2-8°C. Другая представляющая интерес композиция анти-CD20 антител содержит 10 мг/мл антитела в 9,0 мг/мл хлорида натрия, 7,35 мг/мл дигидрата цитрата натрия, 0,7 мг/мл полисорбата 80 и стерильную воду для инъекций, pH 6,5. Еще одна водная фармацевтическая композиция содержит 10-30 мМ ацетата натрия, при pH 4,8-5,5, а предпочтительно, при pH 5,5, полисорбат, используемый в качестве поверхностно-активного вещества в количестве примерно 0,01-0,1% об/об, трегалозу в количестве примерно 2-10% масс/об и бензиловый спирт, используемый в качестве консерванта (патент США 6171586). Лиофилизированные композиции, адаптированные для подкожного введения, описаны в WO 97/04801. Такие лиофилизированные композиции могут быть разведены подходящим разбавителем до высокой концентрации белка, и такая разведенная композиция может быть подкожно введена млекопитающему, подвергаемому лечению в соответствии с настоящим изобретением.

Одна из композиций, содержащая гуманизированные варианты 2H7, включает антитело в концентрации 12-14 мг/мл в 10 мМ гистидина, 6% сахарозы, 0,02% полисорбата 20, pH 5,8. В конкретном варианте изобретения, композиция, содержащая варианты 2H7, а в частности, 2H7.v16, включает 20 мг/мл антитела в 10 мМ сульфата гистидина, 60 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата 20 и стерильную воду для инъекций, pH 5,8.

Описанная здесь композиция может также содержать несколько активных соединений, необходимых для конкретного показания, а предпочтительно, имеющих дополнительные активности, не оказывающие негативного влияния друг на друга. Так, например, может оказаться желательным дополнительное введение цитотоксического средства, химиотерапевтического средства, цитокина или иммунодепрессанта (например, средства, которое действует на Т-клетки, такого как циклоспорин, или антитела, которое связывается с Т-клетками, например, антитела, связывающегося с LFA-1). Эффективное количество таких дополнительных средств зависит от количества антитела, присутствующего в данной композиции, от типа заболевания или расстройства, или от способа лечения, а также от других факторов, обсуждаемых выше. Указанные средства обычно вводят в таких же дозах и таким же способом, как описано в настоящей заявке, или в дозе, составляющей примерно от 1 до 99% от вышеописанных применяемых доз.

Активные ингредиенты могут быть также заключены в микрокапсулы, полученные, например, методами коацервации или путем межфазной полимеризации, например, в гидроксиметилцеллюлозную или желатиновую микрокапсулы и в полиметилметакрилатные микрокапсулы, соответственно, в системы для доставки коллоидальных лекарственных средств (например, в липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии. Такая методика описана в руководстве *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Могут быть получены препараты пролонгированного высвобождения. Подходящими примерами препаратов пролонгированного высвобождения являются полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащих антагонист, где указанные матрицы имеют форму готовых изделий, например, пленок или микрокапсул. Примерами матриц пролонгированного высвобождения являются полиэфир, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поливиниловый спирт), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и этил-L-глутамата, неразлагаемый сополимер этилена-винилацетата, разлагаемые сополимеры молочной кислоты - гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (микросферы для инъекций, состоящие из сополимера молочной кислоты - гликолевой кислоты и ацетата лейпролида), и поли-D-(-)-3-гидроксимасляная кислота.

Композиции, используемые для *in vivo* введения, должны быть стерильными. Это может быть легко осуществлено путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны.

Промышленные изделия и наборы

В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к промышленному изделию, содержащему материалы, используемые для лечения вышеупомянутых заболеваний, например, аутоиммунного заболевания или рака, такого как ХЛЛ. Такое промышленное изделие содержит по меньшей мере один контейнер и этикетку или вкладыш, вложенный в упаковку или наклеенный на контейнер. Подходящими контейнерами являются, например, бутылки, флаконы, шприцы и т.п. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. По меньшей мере один контейнер содержит композицию, которая является эффективной для лечения указанного состояния, и может иметь стерильное входное отверстие (например, таким контейнером может быть пакет для внутривенного введения раствора или сосуд, имеющий пробку, протыкаемую иглой для подкожных инъекций).

В таком промышленном изделии могут присутствовать две терапевтические композиции. В первой композиции по меньшей мере одним активным агентом является Fc-вариант антитела согласно изобретению. На этикетке или во вкладыше, вложенном в упаковку, должно быть указано, что такая композиция используется для лечения конкретного состояния. На этикетке или во вкладыше, вложенном в упаковку, могут также содержаться инструкции по введению таких композиций пациенту. На вкладыше, вложенном в упаковку промышленного изделия, содержащего терапевтические средства, имеются инструкции, которые обычно содержат информацию о показаниях, применении, дозах, способе введения, противопоказаниях и/или предупреждении, относящихся к применению таких терапевтических продуктов. Кроме того, указанное промышленное изделие может также включать контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), забуференный фосфатом

физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Кроме того, оно может также включать и другие материалы, необходимые с точки зрения коммерческого производства и потребителя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

5 Экспериментальные примеры

Нижеследующие экспериментальные примеры приводятся лишь в целях иллюстрации, и не должны рассматриваться как ограничение объема изобретения.

10 Пример 1

Фаговое представление IgG1-Fc человека для отбора моносайтовых мутантов с оптимизированным рН-зависимым связыванием с FcRn человека

Для фагового представления, авторами настоящего изобретения был использован “бесшарнирный” вариант IgG1-Fc человека, в котором дисульфиды шарнирной области были удалены (C226 был deletирован, а C229 заменен остатком Ser), а С-конец был присоединен к С-концевой области белка gIII M13 (g3p) в фагмидной конструкции (pW0437). Последовательность белка (SEQ ID NO:38) представлена на фиг.7. В качестве мишени для фагового отбора, авторы использовали FcRn человека (huFcRn), который был биотинилирован и иммобилизован на покрытых нейтралитином иммуносорбентных планшетах (Maxisorp™), в буфере с рН 6,0, и который тщательно промывали буфером, рН 6,0, для удаления низкоаффинных вариантов, а элюированные рН-чувствительные варианты с более высокой аффинностью промывали буфером при рН 7,4. В третьем раунде отбора, доминантным клоном был N434W (этому варианту соответствовали 44 из 48 секвенированных клонов), при этом, также присутствовали клоны N434Y (3/48) и N434F (1/48).

Для минимизации числа мутаций в Fc (а следовательно, минимизации риска иммуногенности терапевтических антител) библиотеки фагового представления содержали только одну аминокислотную замену. Наиболее широко применяемыми методами создания рандомизированных библиотек фрагментов антител для отбора путем фагового представления, является олигонуклеотид-направленный мутагенез, осуществляемый для одновременного введения мутаций в множество остатков, и неспецифический мутагенез, осуществляемый с помощью ПЦП с вероятностью ошибки или аналогичным методом (см. Clackson & Lowman (eds.), Phage Display: A Practical Approach, Oxford University Press (2004)); однако, обычно, эти методы приводят к введению множества мутаций на одну молекулу, которые должны быть затем восстановлены для определения минимального числа мутаций, необходимых для достижения нужных молекулярных свойств. В качестве альтернативы, авторами настоящего изобретения была сконструирована рандомизированная библиотека путем системного введения мутации каждого остатка по отдельности в 10A FcRn (в структуре, в том случае, если FcRn связывается с IgG, гомологичной структуре FcRn крысы (Burnmeister, 1997)) с помощью олигонуклеотид-направленного мутагенеза. Таким образом, 43 “мини-библиотеки”, каждая из которых состоит из 20 вариантов в конкретном аминокислотном положении (таблица 1), составляют полную библиотеку из 8600 вариантов, используемых для отбора моносайтовых Fc-вариантов с повышенным уровнем рН-зависимого связывания с FcRn.

50

Таблица 1 Остатки, рандомизированные в “бесшарнирном” Fc-варианте IgG1 человека	
Остаток	Остаток
K248	L306

D249	T307
T250	V308
L251	L309
M252	H310
I253	Q311
S254	D312
R255	W313
T256	L314
P257	N315
E258	P343
V259	G385
V284	Q386
H285	P387
N286	M428
A287	H429
K288	E430
T289	A431
K290	L432
	H433
	N434
	H435
	Y436
	T437

Предыдущие попытки проведения отбора на Fc-варианты, которые связываются с FcRn человека с более высокой аффинностью, оказались безуспешными (Dall'Acqua 2002; US2003/0190311). В этих исследованиях, huFcRn непосредственно наносили на планшет Maxisorp. Авторами настоящего изобретения было обнаружено, что huFcRn является очень чувствительным к условиям нанесения на планшет, и для сохранения его способности связываться с Fc, он должен быть биотинилирован и иммобилизован на покрытых нейтравидином планшетах Maxisorp.

Планшеты Maxisorp покрывали 2 мкг/мл нейтравидина в 50 мМ карбонатного буфера, pH 9,6, в течение ночи при 4°C, а затем блокировали аналитическим разбавителем (PBS + 0,5% BSA, pH 6,0). 50 мкл huFcRn (~0,2 мг/мл) биотинилировали путем смешивания с 10 мкл свежеприготовленного 10 мМ биотин-LC-NHS (Pierce) при комнатной температуре в течение 30 минут. Непрореагировавший биотин-LC-NHS инактивировали добавлением 10 мкл 1 М триса. huFcRn-биотин очищали от избыточного количества биотин-триса с помощью гель-фильтрации на колонке PD-10, уравновешенной PBS, pH 6,0 (Amersham-Pharmacia). Было собрано 2 мл продукта (huFcRn-биотин, 5 мкг/мл). huFcRn-биотин иммобилизовали в 8 лунках, покрытых нейтравидином, и лунки блокировали в течение 1 часа (110 мкл/лунку). Планшет три раза быстро ополаскивали аналитическим разбавителем, а затем добавляли фаг.

Фаговые частицы, культивированные в течение ночи до конфлюентности, собирали путем преципитации смесью 2,5М NaCl/20% ПЭГ и ресуспендировали в аналитическом разбавителе, обычно в концентрации 10^{13} фага/мл. Затем фаг разводили 1:10 в аналитическом разбавителе и оставляли для связывания с лунками, покрытыми huFcRn-биотином (или с непокрытыми лунками, используемыми в качестве негативного контроля), примерно на 1 час (100 мкл/лунку). Планшеты промывали PBS + 0,05% твина, pH 6,0. Промывки осуществляли с увеличением жесткости для каждого раунда отбора (первый раунд: 10 быстрых промывок; второй раунд: 20 быстрых промывок; третий раунд: 40 быстрых промывок; четвертый раунд:

16 быстрых промывок и 20 промывок по 15 секунд; пятый раунд: 4 быстрых промывки и одна промывка в течение 3 минут, и эти промывки повторяли 5 раз (всего 20 промывок)). Оставшийся связанный фаг элюировали 110 мкл PBS при pH 7,4 и добавляли к 10 мл культуры *E. coli* в логарифмической фазе роста (XL1-Blue; Stratagene, Inc.) для размножения.

Пример 2

Характеризация растворимых белков Fc-варианта

Растворимые Fc-варианты, имеющие указанные мутации, экспрессировали, очищали и анализировали в анализе на связывание Viascore для определения аффинности связывания этих вариантов с FcRn человека и собакоподобных обезьян, а также с FcRn крысы и мыши. Такие Fc-варианты были также проанализированы с помощью эксклюзионной хроматографии для определения их тенденции к агрегации.

Варианты Fc-фрагментов были экспрессированы путем трансформации клеток *E. coli* 34B8 мутантными фагмидами pW0437, культивирования в течение 24 часов при 30°C в среде, не содержащей фосфата, для индуцирования экспрессии генов Fc и сбора клеток. Клеточную массу замораживали в течение ночи и подвергали лизису путем создания осмотического шока в 10 mM триса, 1 mM EDTA. Лизат осветляли путем центрифугирования и наносили на колонку с белком А. Колонку промывали PBS, растворимый Fc элюировали белок А-цитратным элюирующим буфером (0,1M цитрат, pH 3,0) и нейтрализовали трисом при pH 7,5. Растворимый Fc концентрировали на аппарате Amicon Centriprep.

FcRn человека, FcRn собакоподобных обезьян, а также FcRn мыши и крысы иммобилизовали химическим NHS-методом на чипах Viascore CM5 при различных плотностях (100-3000 единиц отклика). Fc-варианты серийно разводили с 10 мкМ до 1 нМ в PBS при pH 6,0, и в течение определенного периода времени проводили мониторинг связывания. Для родительского “бесшарнирного” Fc (т.е., дикого типа), равновесное связывание с huFcRn достиглось почти сразу, что указывало на то, что Fc имеет очень быструю скорость ассоциации и диссоциации, а Kd составляет приблизительно 700 нМ, как было определено с помощью анализа на равновесие (фиг.8). Для N434W-варианта скорость ассоциации была значительно ниже, а скорость диссоциации была крайне низкой. Путем введения мутации N434W при более низкой скорости потока и в течение более длительного периода времени может быть проведен анализ на равновесие, и в этом случае Kd составляет примерно 4 нМ. N434W-, N434F- и N434A-варианты и тройной мутант N434A + E380A + T307A, очевидно, обладали более высокой аффинностью, которая, например, в ~170 раз, ~9 раз, ~2,7 раз и в ~14 раз превышала аффинность Fc-области дикого типа, соответственно, при pH 6,0. В отличие от этого, при pH 7,4, аффинность N434-вариантов по отношению к huFcRn была слишком низкой и не могла быть измерена в данном анализе. Увеличение аффинности связывания N434W-варианта по сравнению с аффинностью антитела дикого типа не было достаточным для связывания с FcRn собакоподобных обезьян, что указывало на то, что такая аффинность примерно лишь в 10 раз превышала аффинность связывания с FcRn крысы, а фактически, она была такой же, как и аффинность дикого типа в отношении связывания с FcRn мыши (данные не приводятся). Таким образом, повышение аффинности, достигаемое при введении этой мутации, является специфическим для FcRn человека.

Очевидно, что в результате эффекта валентности, агрегированный Fc может обладать более высокой аффинностью связывания с FcRn. Авторами настоящего изобретения были проанализированы Fc-варианты (дикого типа (WT), N434W,

N434Y, N434F, N434A и N434A + E380A + T307A) путем проведения количественной эксклюзионной хроматографии. Очевидно, что все варианты были по меньшей мере на 90% мономерными, за исключением N434W, и имели значительное число димерных, тетрамерных и октамерных форм. Мономерный вариант N434W был очищен от олигомерных форм с помощью препаративной эксклюзионной хроматографии на колонке S-200. Очищенный мономерный материал сохранял свою высокую аффинность связывания с huFcRn в анализе на связывание с SPR, что указывает на то, что повышение аффинности, наблюдаемое для N434W, фактически, обусловлено изменениями его природной аффинности связывания с huFcRn, а не артефактом агрегации. Очищенный олигомерный N434W действительно обнаруживал пониженную аффинность связывания с FcRn (фиг.8).

Пример 3

Характеризация гуманизованных вариантов анти-CD20 IgG1, имеющих мутации в Fc

Мутации, идентифицированные посредством фагового представления Fc человека, были также протестированы на их эффекты по отношению к исходному интактному антителу, 2H7.v138. Антитело 2H7.v138 представляет собой гуманизованное анти-CD20 антитело, в котором Fc, в целях повышения ADCC- и CDC-активности, был модифицирован посредством введения следующих мутаций: S298A, K326A, E333A, K334A. В указанное исходное антитело были введены мутации в положении N434, а IgG (таблица 2) был получен путем кратковременной трансфекции клеток 293, как описано ранее. В каждом случае, было обнаружено, что очищенные варианты IgG имели низкие уровни агрегации белка, как было определено с помощью эксклюзионной хроматографии, описанной выше.

Таблица 2 Варианты гуманизованного анти-CD20 антитела 2H7.v138	
Вариант 2H7	Мутация в Fc
138	-
364	N434A
477	N434W
478	N434F
479	N434Y

Варианты 2H7.v138 IgG1 человека анализировали на pH-зависимое связывание с FcRn человека в ELISA с использованием биотинилированного FcRn. 96-луночные микротитрационные планшеты MaxiSorp (Nunc, Roskilde, Denmark) покрывали 2 мкг/мл нейтравидина (Pierce, Rockford, IL) при 100 мкл/лунку в 50 mM карбонатного буфера, pH 9,6, при 4°C в течение ночи. Планшеты промывали PBS, содержащим 0,05% полисорбат (промывочным буфером), pH 7,4, и блокировали PBS, содержащим 0,5% BSA, pH 7,4, при 150 мкл/лунку. После инкубирования в течение одного часа при комнатной температуре, планшеты промывали промывочным буфером, pH 7,4. FcRn человека биотинилировали с использованием биотина-X-NHS (Research Organics, Cleveland, OH). Биотинилированный FcRn добавляли в планшеты при 2 мкг/мл, 100 мкл/лунку, в PBS, содержащем 0,5% BSA, 0,05% полисорбата 20 (буфер для образцов), pH 7,4. Планшеты инкубировали в течение одного часа и промывали промывочным буфером, pH 6,0. Затем в планшеты добавляли семь двухкратных серийных разведений антител IgG (3,1-200 нг/мл) в буфере для образца, pH 6,0. После инкубирования в течение двух часов планшеты промывали промывочным буфером, pH 6,0. Связанный IgG детектировали путем добавления меченного пероксидазой

козьего F(ab')₂-фрагмента против F(ab')₂ IgG человека (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) при 100 мкл/лунку в буфере для образца, рН 6,0. После инкубирования в течение одного часа планшеты промывали промывочным буфером, рН 6,0, и добавляли субстрат 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ)(Kirkegaard & Perry Laboratories) при 100 мкл/лунку. Реакцию прекращали добавлением 1 М фосфорной кислоты при 100 мкл/лунку. Оптическую плотность считывали при 450 нм на мультисканирующем ридере Ascent (Thermo Labsystems, Helsinki, Finland). Затем вычисляли оптическую плотность в средней точке стандартной кривой (mid-OD).
 Соответствующие концентрации стандарта и образцов в этой средней точке mid-OD определяли по кривой титрования с использованием программы для построения четырехпараметрической нелинейной регрессионной кривой (KaleidaGraph, Synergy software, Reading, PA). Относительную активность вычисляли путем деления концентрации стандарта в средней точке mid-OD на концентрацию образца.

Для оценки диссоциации связанного IgG от FcRn при рН 6,0 или при рН 7,4, проводили аналогичный анализ, за исключением того, что после стадии инкубирования образца и промывки планшетов добавляли 100 мкл/лунку буфера для образца при рН 6,0 или 7,4. Планшеты инкубировали в течение 45 минут и промывали. Затем проводили анализ как описано выше.

Результаты (фиг.9) показали, что относительные аффинности связывания аналогичны аффинностям, наблюдаемым для Fc-вариантов. При рН 6,0, относительные аффинности связывания составляли v477>v478=v479>v364>v138. При рН 7,4, относительные аффинности связывания были стабильно ниже, чем при рН 6,0, причем, эти относительные аффинности связывания распределялись аналогичным образом: v477>v478=v479>v364>v138.

Указанные Fc-мутации могут широко применяться для антител IgG человека.

Пример 4

In vivo исследования влияния связывания с FcRn на фармакокинетические свойства

Для определения влияния повышенной аффинности связывания с FcRn на фармакокинетику этих Fc-вариантов антител *in vivo*, собакоподобным обезьянам (*Macaca fascicularis*) или другим приматам внутривенно инъецировали каждый вариант антитела, и в течение определенного периода времени брали пробы крови для мониторинга клиренса указанного антитела. Нескольким животным инъецировали одну или несколько доз. В одном эксперименте, во время 0 на день 1 вводили одну i.v. дозу 1-20 мг/кг. Перед введением дозы и через 6 ч, 24 ч и 72 ч после введения дозы, у каждого животного брали пробы крови (сыворотки). На 8-ой день, 10-й день, 30-й день и 60-й день брали дополнительные пробы крови. Концентрации антител в пробах сыворотки определяли с помощью ELISA. Зависимое от времени увеличение концентрации антител в сыворотке моделировали стандартными фармакологическими методами (Shargel & Yu, Applied Pharmaceuticals and Pharmacokinetics, Fourth edition, pp.67-98, Appleton & Lange, Stamford, CT (1999)). Для подсчета первоначального распределения антител в тканях (альфа-фаза), а затем распределения в конечной фазе или фазе элиминации (бета-фаза) использовали двух-камерную модель. Вычисленный таким образом полупериод элиминации ($t_{1/2}^{\beta}$) позволил выявить эффект повышения аффинности связывания с FcRn, обусловленный сохранением IgG в кровотоке благодаря функции FcRn.

В одном из таких исследований были проведены сравнения фармакокинетики трех гуманизированных моноклональных анти-BR3 антител (PRO145234, PRO145181 и PRO145182) с различными аффинностями связывания с FcRn собакоподобных

обезьян. BR3 (также известный как BAFF-R) представляет собой трансмембранный белок типа III, состоящий из 184 остатков и экспрессируемый на поверхности В-клеток (Thompson J.S. et al. (2001) Science 293, 2108-2111; Yan M. et al. (2001) Curr. Biol. 11, 1547-1552). PRO145234 представляет собой анти-BR3 антитело дикого типа, а PRO145181 и PRO145182 представляют собой варианты N434A и N434W, соответственно, которые имеют повышенную аффинность связывания с FcRn человека и собакоподобных обезьян.

Семнадцать самцов и 17 самок собакоподобных обезьян (*Macaca fascicularis*) получали от фирмы SNBL USA. На время физического обследования в начале исследования (например, в начале акклиматизации), обезьяны имели возраст 45 лет и массу 24 кг. В исследованиях участвовали только здоровые на вид животные и животные, не имеющие явных отклонений. Тридцать животных были произвольно распределены по их массе по трем группам. Животным в группах 1, 2 и 3 вводили одну i.v. дозу 20 мг/кг PRO145234 (дикого типа), PRO145181 (N434A) или PRO145182 (N434W), соответственно. Протокол исследований систематизирован в Таблице 11.

Таблица 11 Протокол исследований						
Группа	число/ пол	Тест-материал	Способ введения	Уровень дозы (мг/кг)	Конц. дозы (мг/мл)	Объем дозы (мл/кг) ^a
1	5/M, 5/F	PRO145234 (дикого типа)	i.v.	20	20	1
2	5/M, 5/F	PRO145181 (N434A)	i.v.	20	20	1
3	5/M, 5/F	PRO145182 (N434W)	i.v.	20	20	1

Конц. = концентрация
^a Общий объем доз (мл) вычисляли исходя из самой последней измеренной массы тела. Объем доз интерполировали до ближайшего значения 0,1 мл.

Для проведения фармакокинетического анализа, из периферической вены каждого животного брали приблизительно 1,0 мл крови в следующие моменты времени:

- Перед введением дозы.
- Через 30 минут и через 6 часов после введения дозы на 1-й день исследования.
- В дни исследования 2, 3, 4, 5, 8, 11, 15, 18, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85, 92, 99, 106, 113, 120, 127 и 134.

Для проведения анализа на анти-терапевтическое антитело, из периферической вены каждого животного брали приблизительно 1,0 мл крови в следующие моменты времени:

- Перед введением дозы.
- В дни исследования 15, 29, 43, 57, 71, 85, 99, 113, 127 и 134.

Пробы крови для проведения фармакокинетического анализа (ФК) и анализа на анти-терапевтическое антитело (АТА) собирали в пробирки сепаратора для сбора сыворотки и оставляли для свертывания при комнатной температуре приблизительно на 30-80 минут. Сыворотку (приблизительно 0,5 мл) получали путем центрифугирования (2000×g в течение 15 минут при комнатной температуре). Пробы сыворотки переносили в предварительно помеченные 1,5-миллилитровые пробирки Эппендорфа и хранили в холодильнике при температуре от -60°C до -80°C, после чего их помещали на сухой лед, а затем ночью отправляли в лабораторию Genentech для определения концентраций PRO145234, PRO145181 и PRO145182.

Концентрации PRO145234, PRO145181 и PRO145182 в каждой пробе сыворотки определяли с помощью ELISA-анализа. В этом анализе нижний предел количественной оценки (LLOQ) в сыворотке составляет 0,05 мкг/мл. Величины ниже

этого предела регистрировали как пренебрежимо малую величину (LTR).
Антитерапевтические антитела в каждом образце определяли с помощью
перекрывающегося иммуноферментного анализа факторов свертывания крови (ECLA).

В анализе данных использовали номинальную дозу и время сбора образца с
минимальными отклонениями от схемы исследования. Среднее значение и ср.кв.от.
для сывороточных концентраций PRO145234, PRO145181 и PRO145182 у самцов и
самок собакоподобных обезьян вычисляли с использованием программы Excel
(version 2000, Microsoft Corporation, Redmond, WA) и строили график с помощью
программы SigmaPlot (version 9.0; Systat Software, Inc., Point Richmond, CA).
Сывороточные концентрации, которые были меньше регистрируемого предела
величины, исключали из всех анализов данных. Ср. кв.от. не вычисляли, если $n \leq 2$.
Результаты представлены величинами до трех значащих цифр.

Фармакокинетические параметры оценивали с использованием двухкамерной
модели Гаусса-Ньютона (Levenberg & Hartley) со схемой математического
взвешивания $1/\hat{y}$ (WinNonlin Version 3.2; Pharsight Corporation; Mountain View, CA). У
восьми из десяти собакоподобных обезьян в группе 1 (дикого типа; PRO145234) и у
пяти из 10 собакоподобных обезьян в группе 3 (N434W; PRO145182) АТА
вырабатывалось на 57-й день. В общих чертах, обнаружение АТА в конкретный
период времени коррелировало с резким снижением сывороточных концентраций в
течение этого времени или в последующее время, то есть присутствие АТА приводило
к сокращению конечного времени полужизни и снижению времени воздействия
лекарственного средства. Для оценки степени влияния АТА-ответа на
фармакокинетику, средние значения ФК-параметров для каждой группы вычисляли
двумя методами. В методе 1, ФК-параметры (среднее значение \pm стандартное
отклонение) вычисляли с использованием данных, полученных для всех 10
собакоподобных обезьян в каждой группе. В методе 2, ФК-параметры вычисляли с
использованием данных, полученных только для собакоподобных обезьян, у которых
не вырабатывались анти-терапевтические антитела на день 57 ($n = 2$ для группы 1, $n =$
10 для группы 2 и $n = 5$ для группы 3). Для групп 1 и 3, метод 1 давал более низкие
величины конечного времени полужизни ($t_{1/2,\beta}$) и времени воздействия
лекарственного средства (AUC; мера общего воздействия лекарственного средства) по
сравнению с методом 2. Однако, в целом, результаты для двух этих методов были
аналогичными. Поэтому, средние величины зарегистрированных ФК-параметров
вычисляли методом 1 (например, включая данные для всех собакоподобных обезьян).

Результаты

После одного i.v. введения ударной дозы 20 мг/кг PRO145234 (антитела дикого
типа), PRO145181 (вариант N434A) и PRO145182 (вариант N434W), сывороточные
концентрации обнаруживали двухфазное распределение, при этом, наблюдалась
быстрая начальная фаза распределения с последующей более медленной фазой
элиминации (фигура 12). Оцениваемые ФК-параметры для каждой группы
представлены в таблице 12 и включают данные для всех десяти собакоподобных
обезьян в каждой группе. Конечное время полужизни (среднее \pm ср.кв.от.) PRO145234
(антитела дикого типа) составляло $6,15 \pm 2,01$ дней и варьировалось от 4,24 до 11,0
дней у десяти собакоподобных обезьян. Среднее конечное время полужизни ($t_{1/2,\beta}$)
PRO145234 у двух собакоподобных обезьян, у которых на 57-й день не
вырабатывались АТА, составляло 8,95 дней. Для PRO145181 (вариант N434A), среднее
конечное время полужизни составляло $1,41 \pm 1,55$ дней, и в 1,6-2,3 раза превышало
время полужизни PRO145234 ($p < 0,05$). Для PRO145182 (вариант N434W), среднее

значение \pm ср.кв.от. конечного времени полужизни у десяти собакоподобных обезьян составляло $9,55 \pm 2,49$ дней. Эта величина значительно превышала общую среднюю величину $t_{1/2,\beta}$ PRO145234 (антитела дикого типа) у десяти собакоподобных обезьян ($p < 0,05$), но была почти аналогична средней величине $t_{1/2,\beta}$ PRO145234 у двух собакоподобных обезьян, у которых не вырабатывались детектируемые уровни АТА (8,95 дней). Вероятно, что наблюдаемое различие в величинах $t_{1/2,\beta}$ для PRO145234 (антитела дикого типа) и для PRO145182 (варианта N434W) не соответствовало истинному из-за АТА-ответа у животных этих двух групп.

Площадь под кривой (AUC) зависимости концентрации от времени, экстраполированной до ∞ (бесконечности) для PRO145234 (антитела дикого типа), составляла 2440 ± 398 день \cdot мкг/мл и варьировалась в пределах от 1740 до 3140 день \cdot мкг/мл для десяти собакоподобных обезьян. Среднее значение AUC для PRO145234 у двух собакоподобных обезьян, у которых на 57-й день не вырабатывалось АТА, составляло 2850 день \cdot мкг/мл. Для PRO145181 (варианта N434A), среднее значение AUC составляло 4450 ± 685 день \cdot мкг/мл и в 1,6-1,8 раз превышало значение для PRO145234 (антитела дикого типа) ($p < 0,05$). Какого-либо различия между AUC для PRO145234 (антитела дикого типа) и для PRO145182 (варианта N434W) не наблюдалось.

Таблица 12 ФК-параметры (среднее \pm ср. откл.) для PRO145234, PRO145181 и PRO145182				
ФК-параметр		PRO145234*	PRO134181	PRO145182*
$t_{1/2,3}$ (дни):	среднее \pm ср. откл. (интервал)	6,15 \pm 2,01 (4,24-11,0)	14,1 \pm 1,55** (12,3-16,5)	9,55 \pm 2,49** (6,86-15,0)
AUC(день \cdot мкг/мл)	среднее \pm ср. откл. (интервал)	2440 \pm 398 (1740-3140)	4450 \pm 685** (3390-5560)	2105 \pm 438 (1500-2770)
* Присутствие антител против лекарственных средств у 8/10 и 5/10 собакоподобных обезьян в группах, которым вводили PRO145234 и PRO145182, может давать ложные результаты в отношении ФК-параметров PRO145234 и PRO145182 (например, уменьшение величины AUC и снижение времени $t_{1/2,\beta}$).				
** Отличие от PRO145234 с $p < 0,05$.				

В целом, фармакокинетику PRO145234, PRO145181 и PRO145182 оценивали после введения собакоподобным обезьянами одной i.v. дозы 20 мг/кг. У восьми из 10 собакоподобных обезьян, которым вводили PRO145234, вырабатывались анти-терапевтические антитела (АТА) на 56-й день, и у пяти из 10 собакоподобных обезьян, которым вводили PRO145182, также вырабатывались АТА на 56-й день. У собакоподобных обезьян, которым вводили PRO145181, антитела АТА не вырабатывались на 56-й день. PRO145181 (вариант N343A) обнаруживал увеличение конечного времени полужизни и увеличение AUC по сравнению с PRO145234 (антителом дикого типа) ($p < 0,05$). PRO145182 обнаруживал небольшое увеличение конечного времени полужизни по сравнению с PRO145234; однако, вероятно, что такое наблюдаемое различие является ложным результатом, обусловленным вырабатыванием анти-терапевтического антитела в ответ на введение PRO145234 и PRO145182.

Пример 5

Варианты IgG1 человека с повышенной аффинностью связывания с Fc γ RIII

Для повышения антитело-зависимой клеточно-опосредуемой цитотоксичности (ADCC) посредством повышения аффинности связывания IgG с активирующими Fc γ -рецепторами и снижения аффинности связывания IgG с ингибирующими Fc γ -рецепторами были введены мутации, описанные ранее (Shields et

al., J. Biol. Chem. 276:6591-6604 (2001); Presta et al., Biochem. Soc. Trans. 30:487-490 (2002)). Мутации, повышающие ADCC-активность при сохранении или увеличении комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), представляют особый интерес, поскольку оба эти механизма могут играть важную роль в лизисе CD20-позитивных клеток *in vivo*. В частности, три Ala-мутации, зятые в комбинации, а именно: S298A+E333A+K334A, были ранее идентифицированы как мутации, повышающие CDC-активность в результате повышения аффинности связывания с C1q (Idusogie et al., J. Immunol. 164:4178-4184 (2000)); Idusogie et al. J. Immunol. 166:2571-2575 (2001)) и повышающие ADCC-активность в результате повышения уровня связывания с FcγRIII и снижения уровня связывания с FcγRII (Shields et al., 2001). Эти мутации, вместе с другой заменой, повышающей ADCC- и CDC-активность, а именно, K326A, были внесены в гуманизованный вариант анти-CD20 антитела, известный как 2H7.v138 (таблица 3).

В настоящей заявке описаны дополнительные аминокислотные замены в положениях 298, 333 и 334. Каждую замену вводили в исходное 2H7.v16 и сравнивали с v16 в ELISA-анализе на относительное связывание с высокоаффинным или с низкоаффинным изотипом FcγRIII человека (фиг.11). Эти результаты показали, что несколько замен в этих положениях, таких как S298T, S298L, E333L и K334G, были вполне допустимыми и оказывали незначительное влияние на аффинность связывания с FcγRIII (таблица 1). Другие замены, такие как S298G, E333G и K334R, оказывали негативное влияние на связывание, что было обусловлено либо нежелательными взаимодействиями этих боковых цепей с рецептором, либо дестабилизирующим воздействием на структуру Fc. Одна мутация, K334L, была идентифицирована как мутация, которая приводила к увеличению аффинности связывания с FcγRIII более, чем в 3 раза.

Эти результаты показали, что другие замены, помимо Ala, в выбранных положениях Fc, которые дают эффекты в комбинации с Ala-заменами, могут приводить к повышению уровня связывания с Fcγ-рецепторами. В частности, замена K334L приводит к повышению уровня связывания с FcγRIII и может дополнительно повышать уровня связывания в комбинации с другими Fc-мутациями, такими как мутации в 2H7.v138. Было высказано предположение, что такие варианты антител обладают повышенной ADCC-активностью и являются более эффективными в отношении истощения клеток-мишеней *in vivo*.

Таблица 3

Влияние замен в Fc-области на связывание с CD20. Fc-мутации представлены в соответствии с Европейской нумерацией (EU) (по Кэбату, см. выше) и были сделаны в родительском антителе 2H7.v16. Относительное связывание выражают как концентрацию 2H7.v16, деленную на концентрацию варианта, необходимую для эквивалентного связывания; а следовательно, отношение <1 указывает на более низкую аффинность для данного варианта, а отношение >1 указывает на более высокую аффинность. Представлены также результаты для изотипов F158 (низкая аффинность) и V158 (высокая аффинность) FcγRIII.

Вариант 2H7	Замены в Fc	Относительное связывание с FcγRIII (F158)	Относительное связывание с FcγRIII (V158)
16	-	-1-	-1-
138	S298A, E333A, K334A, K326A	36	12
365	S298T		0,91
367	S298L		1,1
368	S298G		0,56
370	E333L		1,1
371	E333G		<0,1
375	K334L		3,3
376	K334G		1,2
377	K334R		<0,1

Пример 6Гистидиновые мутанты

В данном примере, точковые мутации были проанализированы посредством гистидинового сканирования (His-сканирования) остатков пограничной области между Fc и FcRn, полученной из опубликованной структуры IgG крысы в комплексе с FcRn крысы (Burnmeister, 1997). Авторы настоящего изобретения пришли к заключению, что замены His могут оказаться предпочтительными для рН-зависимого воздействия на связывание IgG с FcRn, поскольку титр боковой цепи His часто определяется при рН 6-7. Замены His в сайте Fc, где для связывания с FcRn предпочтительной является протонированная форма, но не непротонированная форма, должны приводить к получению желательных свойств, обеспечивающих увеличение времени полужизни данной молекулы *in vivo*.

Авторы настоящего изобретения проели дополнительную характеристику ранее описанных точковых мутаций, внесенных в полноразмерное антитело (Herceptin®), и исследование свойств нескольких новых вариантов, включая комбинации точковых мутаций.

Конструирование FcRn-вариантов трастузумаба

В предыдущих примерах описаны некоторые мутации в Fc, которые приводят к увеличению аффинности связывания с FcRn, и которые были исследованы в Fc-фрагментах или в остове интактного антитела 2H7.v138. Для исследования влияния этих мутаций на полноразмерный IgG1 человека, в котором отсутствуют другие Fc-варианты, в остов исходного rhuMab 4D5 (трастузумаба, герцептина®) были введены мутации N434W, N434Y, N434F и N434A с помощью олигонуклеотидного сайт-направленного мутагенеза, описанного ранее. Поскольку три из четырех ароматических аминокислот имели замены в положении N434, введенные с использованием Fc-фаговых библиотек точковых мутаций, авторами был сделан вывод, что, в основном, ароматические замены приводят к повышению аффинности связывания с FcRn (при низком рН, и возможно, при высоком рН). Поэтому была также введена дополнительная мутация N434H. Эти 5 вариантов герцептина выделяли из крупномасштабных нестационарных клеточных культур СНО путем проведения аффинной хроматографии на белке А и последующей эксклюзионной хроматографии для удаления агрегатов.

Кроме того, в герцептин были введены мутации E380A, E380A + T307A, +/- N434A, и +/- N434H. Антитела были экспрессированы в клетках 293, очищены с помощью хроматографии на белке А и проанализированы на связывание с FcRn.

Для идентификации дополнительных остатков, играющих важную роль в связывании с FcRn, и мутаций, повышающих аффинность связывания, был применен метод гистидинового сканирования. В этих экспериментах остатки, присутствующие в пограничной области между Fc и FcRn, заменяли гистидиновыми остатками (в соответствии с гомологией структуры FcRn крысы (Burnmeister, 1997)). Антитела с такими мутациями были экспрессированы в клетках 293, очищены и проанализированы на связывание, как описано выше. Мутации, полученные посредством гистидинового сканирования и повышающие аффинность связывания с FcRn, объединяли с мутациями в положении N434, в результате чего получали дополнительную серию вариантов.

ELISA FcRn

Растворимый FcRn получали как было описано ранее (Shields et al., 2001). 96-луночные микротитрационные планшеты MaxiSorp (Nunc, Roskilde, Denmark)

покрывали 2 мкг/мл нейтравидина (Pierce, Rockford, IL) при 100 мкл/лунку в 50 мМ карбонатного буфера, рН 9,6, при 4°С в течение ночи. Планшеты промывали PBS, содержащим 0,05% полисорбат (промывочным буфером), рН 7,4, и блокировали PBS, содержащим 0,5% BSA, рН 7,4, при 150 мкл/лунку. После инкубирования в течение
 5 одного часа при комнатной температуре, планшеты промывали промывочным буфером, рН 7,4. FcRn человека биотинилировали с использованием биотина-X-NHS (Research Organics, Cleveland, OH). Биотинилированный FcRn добавляли в планшеты при 2 мкг/мл, 100 мкл/лунку, в PBS, содержащем 0,5% BSA, 0,05% полисорбата 20
 10 (аналитический буфер), рН 7,4. Планшеты инкубировали в течение одного часа и промывали промывочным буфером, рН 6,0. Затем в планшеты добавляли семь двухкратных серийных разведений антител IgG (3,1-200 нг/мл) в аналитическом буфере, рН 6,0. В качестве стандарта использовали герцептин. После инкубирования в течение
 15 двух часов, планшеты промывали промывочным буфером, рН 6,0. Стадию диссоциации проводили путем добавления аналитического буфера при рН 6,0 или при рН 7,4, 100 мкл/лунку. Планшеты инкубировали в течение 45 минут и промывали промывочным буфером, рН 6,0. Связанный IgG детектировали путем добавления меченного пероксидазой козьего F(ab')₂-фрагмента против F(ab')₂ IgG
 20 человека (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) при 100 мкл/лунку в аналитическом буфере, рН 6,0. После инкубирования в течение одного часа, планшеты промывали промывочным буфером, рН 6,0, и добавляли субстрат 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ)(Kirkegaard & Perry Laboratories) при 100 мкл/лунку. Реакцию прекращали
 25 добавлением 1 М фосфорной кислоты при 100 мкл/лунку. Оптическую плотность считывали при 450 нм на мультисканирующем ридере Ascent (Thermo Labsystems, Helsinki, Finland). Затем вычисляли оптическую плотность в средней точке кривой для герцептина при рН 6,0 (mid-OD). Соответствующие концентрации герцептина и образцов в этой средней точке mid-OD определяли по кривой титрования с
 30 использованием программы для построения четырехпараметрической нелинейной регрессионной кривой (KaleidaGraph, Synergy software, Reading, PA). Относительную активность вычисляли путем деления концентрации стандарта в средней точке mid-OD на концентрацию образца.

Методы BIACORE

35 Кажущаяся скорость ассоциации (k_a), кажущаяся скорость диссоциации (k_d) и кажущаяся константа (K_D) нескольких вариантов 4D5, связывающихся с FcRn человека и собакоподобных обезьян, измеряли методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием системы BIACore-3000 (6,7). Аффинность связывания
 40 каждого антитела с антигеном, определяемая по вышеописанной кажущейся константе равновесной диссоциации, вычисляли (7) по формуле $K_D = k_d / k_a$, а также непосредственно измеряли в экспериментах по равновесному связыванию.

45 Иммобилизацию FcRn человека и собакоподобных обезьян на биосенсорном чипе с карбоксиметилированным декстраном (cat. # CM5, BIACore Inc.) осуществляли методом конъюгирования с амином, в основном, в соответствии с инструкциями производителей (6,8). Вкратце, биосенсорный чип активировали с использованием гидрохлорида N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) в смеси с
 50 N-гидроксисукцинимидом (NHS). Затем FcRn, предварительно уравновешенный в 10 мМ ацетата натрия, рН 4, инъецировали на активированный чип с получением концентраций 700-900 единиц отклика (RU) иммобилизованного FcRn собакоподобных обезьян и приблизительно 2000 RU FcRn человека. Непрореагировавшие

сукцинимидные группы блокировали путем введения 1М этаноламина.

Кинетику реакции измеряли следующим образом. 3-кратные серийные разведения (1 мкМ - 0,5 нМ) антитела инъецировали в течение 2 минут в рабочем буфере (в забуференном фосфатом физиологическом растворе, рН 6, содержащем 0,05% твина-20) при 25°C и при скорости потока 0,02 мл/мин. Регенерация была достигнута путем введения 0,01 мл 10 мМ триса, рН 9, 150 мМ NaCl. По этим данным строили кривую простой лангмуровской модели связывания 1:1 для каждого антитела.

Константы скорости псевдо-первого порядка (k_s) вычисляли для каждой кривой ассоциации и строили график зависимости от концентрации белка с получением $k_a \pm SE$ (стандартная ошибка при подборе эмпирической кривой). Измерения равновесного связывания проводили при рН 6 и при рН 7,4. 3-кратные серийные разведения (1 мкМ - 0,5 нМ) антитела инъецировали в течение 6 минут в рабочем буфере (в забуференном фосфатом физиологическом растворе, содержащем 0,05% твина-20) при 25°C и при скорости потока 2 мкл/мин. После инъекции скорость потока увеличивали до 0,02 мл/мин. Регенерация была достигнута путем введения 0,01 мл 10 мМ триса, рН 9, 150 мМ NaCl. После этого строили кривую зависимости количества антитела, связанного при равновесии (R_{eq}), от концентрации антитела, а затем строили четырехпараметрическую кривую “доза - ответ” для определения K_D .

Результаты ELISA

Был определен уровень связывания с FcRn при рН 6,0 и 7,4. Относительные аффинности связывания были вычислены как описано в разделе “Материалы и методы” и представлены в таблице 4. Эти результаты показали, что варианты с мутациями N434A, N434W, N434Y, N434F или N434H давали повышенный уровень связывания при рН 6. Увеличение уровня связывания, по сравнению с герцептином, также наблюдалось для вариантов N434W, N434Y и N434F при рН 7,4.

Таблица 4

Результаты FcRn-ELISA-анализа для мутантов с точковой мутацией N434. Относительные величины связывания >1 указывают на повышение уровня связывания, а величины связывания <1 указывают на снижение уровня связывания, по сравнению с родительской молекулой герцептина.

Мутант	Отношение уровня связывания мутанта при рН 6,0 к уровню связывания герцептина при рН 6,0	Отношение уровня связывания мутанта при рН 7,4 к уровню связывания при рН 6,0
N434A	3,44	0,01
N434W	77,45	12,26
N4334Y	27,56	2,01
N434F	32,15	2,09
N434H	19,85	0,69

Комбинация вариантов с N434H или N434A и ранее описанные Ala-замены (Shields et al., 2000) также обнаруживали повышенный уровень связывания при рН 6,0, но, при этом, обнаруживали незначительное повышение уровня связывания, или вообще не обнаруживали повышение уровня связывания при рН 7,4 (таблица 5).

Таблица 5

Результаты FcRn-ELISA-анализа для мутантов с комбинацией мутаций N434. Относительные величины связывания >1 указывают на повышение уровня связывания, а величины связывания <1 указывают на снижение уровня связывания, по сравнению с родительской молекулой герцептина.

Мутант	Отношение уровня связывания мутанта при рН 6,0 к уровню связывания герцептина при рН 6,0	Отношение уровня связывания мутанта при рН 7,4 к уровню связывания герцептина при рН 6,0
T307A, E380A	9,9	0,33
T307A, E380A, N434H	42,91	1,33
T307A, E380A, N434A	14,23	0,86

His-сканрование пограничной области Fc позволило идентифицировать несколько замен His, которые повышают или снижают уровень связывания с FcRn (таблица 6). Было обнаружено, что некоторые из этих вариантов обнаруживают рН-зависимое связывание, но, при этом, они обнаруживают незначительное взаимодействие с FcRn при рН 7,4, или вообще не обнаруживают какого-либо детектируемого взаимодействия. Хотя ни одна из этих дополнительных His-мутаций не приводила к большему увеличению уровня связывания при рН 6, чем мутация N434H, однако, каждая из замен Q311H, D312H, N315H и G385H приводила к более, чем 4-кратному увеличению уровня связывания при рН 6, но не приводила к значимому увеличению уровня связывания при рН 7,4.

Таблица 6

Результаты FcRn-ELISA-анализа для His-сканированных мутантов. Относительные величины связывания >1 указывают на повышение уровня связывания, а величины связывания <1 указывают на снижение уровня связывания, по сравнению с родительской молекулой герцептина.

Мутант	Отношение уровня связывания мутанта при рН 6,0 к уровню связывания герцептина при рН 6,0	Отношение уровня связывания мутанта при рН 7,4 к уровню связывания герцептина при рН 6,0
K248H		
D249H	1,96	
T250H	0,88	
L251H	0,14	
M252H		
I253H		
S254H	<0,4	
R255H	1,52	
E258H	2,2	0,22
V284H	0,66	<0,02
H285Y	1,33	0
N386H		
A287H	1,11	<0,02
K288H	1,01	0,11
T289H	1,73	0,03
K290H	0,81	<0,02
L306H	0,85	0,02
L307H	3,5	0,06
V308H	2,92	0,08
L309H	0,51	<0,03
H310Y	0,01	<0,01
Q311H	6,72	0,14
D312H	4,38/6,79	0,1
W313H	0,2	0,18
L314H	0,36	<0,01
N315H	5,13	0,07
V305H	1,89	<0,02
K317H	1,03	<0,01
P343H		
K360H	3,07	<0,03
E362H	0,44	<0,01
E380H	3,14	<0,06
E382H		
G385H	5,35	1,6
Q386H	2,24	<0,03
P387H	1,57	<0,03
H429Y	нет связывания	0
E430H	2,85	0,02
A431H	3,55	0,07
L432H	1,8	0,04
Y436H	0,28	<0,01
T437H	1,94	<0,03

И наконец, несколько точковых мутаций, внесенных посредством His-сканирования, были попарно скомбинированы с мутациями N434A или N434H. Из

этих вариантов, двойные мутанты T289H/N434H и N315H/N434H обнаруживали наибольшее увеличение уровня связывания при pH 6, но не обнаруживали явного увеличения связывания при pH 7,4.

Таблица 7

5 Результаты FcRn-ELISA-анализа для His-сканированных мутантов с комбинированными мутациями. Относительные величины связывания >1 указывают на повышение уровня связывания, а величины связывания <1 указывают на снижение уровня связывания, по сравнению с родительской молекулой герцептина.

Мутант	Отношение уровня связывания мутанта при pH 6,0 к уровню связывания герцептина при pH 6,0	Отношение уровня связывания мутанта при pH 7,4 к уровню связывания герцептина при pH 6,0
D249H, N434A		
D249H, N434H		
R255H, N434A	2,95	0,03
R255H, N434H		
E258H, N434A	5,55	$<0,12$
E258H, N434H	6,14	0,15
T289H, N434A	8,5	0,11
T289H, N434H	13,06	0,16
D312H, N434A	8,9	0,63
D312H, N434H	9,09	0,36
N315H, N434A	5,48	0,09
N315H, N434H	14,24	0,65

Результаты анализа VIAcore

В результате проведения ELISA-анализа на связывание с FcRn было отобрано несколько антител, и эти антитела были подразделены на три группы для проведения анализа VIAcore. Группа 1 состояла, главным образом, из мутантов по положению Asn434, группа 2 состояла из мутантов, полученных путем гистидинового сканирования, а группа 3 состояла из ранее полученных и описанных мутантов (3). Результаты кинетического анализа и анализа на равновесное связывание антител группы 1 при pH 6 (таблица 8) позволяют предположить, что увеличение значения K_D является результатом изменения величин k_a и/или k_d . Кроме того, мутанты, которые обладают повышенной способностью связываться с FcRn человека, очевидно, также обладают повышенной способностью связываться с FcRn собакоподобных обезьян. Мутантами, обладающими наибольшей способностью связываться с FcRn при pH 6, являются мутанты с заменами N434W, N434Y и N434F. Однако, эти мутанты также обнаруживали значимое увеличение уровня связывания при pH 7,4. В противоположность этому, герцептин, N434A, N434H и T250Q/M428L обнаруживали незначительный уровень связывания при pH 7,4 или вообще не обнаруживали какого-либо связывания при pH 7,4. Следует отметить, что уровень связывания N434W, N434Y и N434F при pH 7,4 значительно превышал уровень связывания Fc дикого типа, а скорость ассоциации и диссоциации была настолько высокой, что константы равновесной диссоциации не могли быть точно определены. Поэтому, уровень связывания при pH 7,4 был указан в таблице 4 как + или -. В частности, знак - означает уровни связывания, аналогичные уровням связывания с герцептином, знак +/- означает пренебрежимо малый уровень связывания, знак + означает заметное увеличение уровня связывания, а знак ++ означает значимый уровень связывания.

50

Белок	$k_a (\times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	$k_d (\times 10^{-2} \text{ s}^{-1})$	KD^a (нМ)	KD^b (нМ)	Связывание при pH 7,4
huFcRn					

	Герцептин	9,76	8,85	90,6	189	-
	N434A	10,3	4,12	39,9	90,94	-
	N434W	35,9	0,54	1,51	9,61	++
	N434Y	33	1,25	3,78	21,89	++
5	N434F	25,2	1,11	4,41	28,21	++
	N434H	20,2	2,92	14,5	49,63	+/-
	T250Q/M428L ^c	12,5	1,9	15,2	44,38	+/-
	FcRn собакоподобных обезьян					
	Герцептин	9,77	5,25	53,7	103,2	-
10	N434A	22,5	1,62	7,19	41,1	-
	N434W	38	0,29	0,76	4,08	++
	N434Y	40,5	0,45	1,1	9,24	++
	N434F	29,7	0,59	1,98	12,14	++
	N434H	36,9	1,45	3,91	26,84	+/-
	T250Q/M428L ^c	16,9	0,78	4,62	21,39	+/-
15	^a K _D , вычисленная по кинетическим параметрам. ^b K _D , вычисленная в экспериментах по равновесному связыванию. ^c Белки экспрессировались в клетках 293.					

20 Существуют некоторые различия между K_D, определенными в анализе кинетических параметров связывания и в анализе на равновесное связывание. Однако в результате сравнения этих величин был получен коэффициент корреляции, который составлял 0,994 для связывания с FcRn человека, и 0,934 для связывания с FcRn собакоподобных обезьян, что позволяет сделать предположение о наличии системного отклонения.

25 Анализы антител группы 2 на кинетические параметры связывания и на равновесное связывание (таблица 9) дали результаты, аналогичные результатам для антител группы 1. Мутанты, которые обладали повышенной способностью связывания с FcRn человека, также обладали повышенной способностью связываться с FcRn собакоподобных обезьян. Мутантами, обладающими наибольшей способностью связываться с FcRn при pH 6, являются мутанты с заменами N434H/T370A/E380A, N434H/T289H и N434H/N315H. Однако эти мутанты также обнаруживали значимое увеличение уровня связывания при pH 7,4. В 30 противоположность этому, остальные антитела обнаруживали незначительный уровень связывания при pH 7,4 или вообще не обнаруживали какого-либо связывания при pH 7,4.

40 Таблица 9
Сравнение кинетических параметров связывания и параметров равновесного связывания мутантов группы 2

Белок	k _a (×10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (×10 ⁻² s ⁻¹)	KD ^a (нМ)	KD ^b (нМ)	Связывание при pH 7,4
huFcRn					
Герцептин	12,6	7,16	56,9	156,9	-
N434H/T370A/E380A ^c	54,2	0,93	1,71	23,43	++
45 N434H/T289H ^c	44,9	1,11	2,46	27,48	+
N434H/N315H ^c	51	1,34	2,63	25,33	+/-
G385H ^c	20,9	3,67	17,5	286,6	-
D312H ^c	13,4	1,61	12	75,42	-
N315H ^c	8,14	2,14	26,3	61,08	-
50 N434H	35,2	1,83	5,19	37,29	-
FcRn собакоподобных обезьян					
Герцептин	15,9	9,79	61,6	114,3	-
N434H/T370A/E380A ^c	51,9	1,19	2,29	19,03	++

N434H/T289H ^c	55,8	1,11	1,98	20,46	+
N434H/N315H ^c	57	1,29	2,25	18,47	+/-
G385H ^c	19,1	3,94	20,6	40,95	-
D312H ^c	10,9	3,41	31,3	55,41	-
N315H ^c	8,3	2,46	29,6	47,68	-
N434H	33,6	2,02	6,02	26,29	-
^a K _D , вычисленная по кинетическим параметрам.					
^b K _D , вычисленная в экспериментах по равновесному связыванию.					
^c Белки экспрессировались в клетках 293.					

Оценка коэффициента корреляции между K_D, определенными в анализе кинетических параметров связывания и в анализе на равновесное связывание, показала, что коэффициент корреляции для связывания с FcRn человека составлял 0,246, а коэффициент корреляции для связывания с FcRn собакоподобных обезьян составлял 0,966. Причиной низкого коэффициента корреляции для связывания с FcRn человека является мутация G385H, присутствие которой связано с некоторыми проблемами агрегации в процессе равновесного связывания. После исключения этого частного значения данных получали коэффициент корреляции 0,916.

Анализ кинетических параметров связывания и анализ на равновесное связывание для антител группы 3 (таблица 10) дали результаты, аналогичные результатам для антител группы 1. Мутанты, которые обладали повышенной способностью связывания с FcRn человека, также обладали повышенной способностью связывания с FcRn собакоподобных обезьян. Мутант с комбинированной мутацией T250Q/M428L обладал наибольшей способностью связывания с FcRn при pH 6. Хотя этот мутант имел несколько повышенный уровень связывания при pH 7,4, однако, этот уровень был низким по сравнению с уровнями для мутантов групп 1 и 2.

Белок	k _a (×10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (×10 ⁻² s ⁻¹)	KD ^a (нМ)	KD ^b (нМ)	Связывание при pH 7,4
huFcRn					
Герцептин	5,47	11,4	209	172,1	-
T250Q ^c	7,16	6,27	87,6	59,9	-
M428L ^c	5,92	5,43	91,7	56,4	-
T250Q/M428L ^c	9,62	3,09	32,2	32,8	+/-
FcRn собакоподобных обезьян					
Герцептин	12,8	7,63	59,8	49,5	-
T250Q	15,7	2,29	14,6	17,7	-
M428L ^c	9,83	3,41	34,7	20,7	-
T250Q/M428L ^c	13,5	1,72	12,7	6,8	+/-
^a K _D , вычисленная по кинетическим параметрам.					
^b K _D , вычисленная в экспериментах по равновесному связыванию.					
^c Белки экспрессировались в клетках 293.					

Оценка коэффициента корреляции между K_D, определенными в анализе кинетических параметров связывания и в анализе на равновесное связывание, показала, что коэффициент корреляции для связывания с FcRn человека составлял 0,966, а коэффициент корреляции для связывания с FcRn собакоподобных обезьян составлял 0,902.

Авторами настоящего изобретения ранее сообщалось, что аффинности связывания

“бесшарнирных” Fc, содержащих мутации N434W, N434F и N434A, с FcRn человека в 170; 9; и 2,7 раз превышали аффинности связывания дикого типа при pH 6. В этом примере авторами были проанализированы эти и другие мутации для полноразмерного антитела 4D5. При сравнении результатов, полученных в анализе на равновесное связывание, авторами настоящего изобретения было обнаружено, что мутации N434W, N434F и N434A приводили к 20-, 7- и 2-кратному увеличению аффинности связывания с FcRn человека при pH 6. Аналогичные результаты наблюдались при связывании с FcRn собакоподобных обезьян. Другие варианты, содержащие замены ароматических аминокислот, такие как N434Y и N434H, обнаруживали 9- и 4-кратное увеличение уровня связывания с FcRn человека при pH 6. Однако все N434W-, N434Y- и N434F-мутанты также обнаруживали повышенный уровень связывания с FcRn человека и собакоподобных обезьян при pH 7,4.

Принимая во внимание многообещающие результаты, полученные для N434H-мутаций, и важную роль гистидиновых остатков в pH-зависимом взаимодействии Fc-FcRn (9), авторами настоящего изобретения было принято решение провести исследование гистидиновых мутаций в других условиях. Исходя из структуры, определенной для комплекса Fc-FcRn крысы (9,10) и предполагаемой гомологии с белками человека, было проведено гистидиновое сканирование. Кроме того, были проведены исследования мутации N434H в комбинации с мутациями T370A и E380A, идентифицированными Presta и коллегами (4). Вариантами, которые обнаруживали увеличение уровня связывания при pH 6, но не обнаруживали увеличение уровня связывания при pH 7,4, как показал анализ VIAcore, являются варианты G385H, D312H, N315H и N434H. Ни одна из новых гистидиновых мутаций или гистидиновых комбинированных мутаций не давало такого увеличения уровня связывания с FcRn при pH 6, которое было бы намного выше уровня связывания, сообщаемого лишь одной мутацией N434H. Однако все комбинированные мутации обнаруживали значимое увеличение уровня связывания с FcRn при pH 7,4. Дополнительные варианты, содержащие комбинации двух или нескольких гистидиновых мутаций, могут обладать повышенной способностью к pH-зависимому связыванию с FcRn. Кроме того, идентификация сайтов, на которые влияют His-мутации, позволяет предположить о наличии новых сайтов для дополнительных аминокислотных замен.

И наконец, авторами настоящего изобретения были также исследованы мутации, описанные Hinton и коллегами (3) для молекулы IgG1. Хотя они сообщали, что мутации T250Q, M428L и T250Q/M428L, внесенные в остов молекулы IgG2, приводили к 3-, 7- и 28-кратному увеличению уровня связывания при pH 6, соответственно, однако, в случае молекулы IgG1, авторы настоящего изобретения наблюдали более скромное увеличение уровня связывания, то есть, в 3, 3 и 5 раз, соответственно. Аналогичные результаты наблюдались для связывания с FcRn собакоподобных обезьян. Мутанты с одной заменой не обнаруживали увеличения уровня связывания с FcRn человека или собакоподобных обезьян при pH 7,4, а двойной мутант обнаруживал лишь небольшое увеличение уровня связывания.

В этом исследовании, авторами настоящего изобретения были количественно оценены аффинности связывания нескольких Fc-мутантов с FcRn человека и собакоподобных обезьян при pH 6 и pH 7,4. Авторами настоящего изобретения было установлено, что все аффинности и увеличения аффинностей связывания данной молекулы с FcRn человека и FcRn собакоподобных обезьян были аналогичными. Систематизация вариантов с повышенной аффинностью связывания при pH 6,

проводимая на основе анализов ELISA и BIAcore, в основном, совпадала, однако, оценки связывания при рН 7,4 иногда отличались. Такое несоответствие может быть обусловлено различиями в поведении FcRn или IgG в различных применяемых процедурах иммобилизации.

5 **Библиография для примера 6**

Ссылки

1. Ghetie, V., and Ward, E. S. (2000) *Anna Rev Immunol* **18**, 739-766
2. Ghetie, V., and Ward, E. S. (1997) *Immunol Today* **18**, 592-598
- 10 3. Hinton, P. R., Johlfs, M. G., Xiong, J. M., Hanestad, K., Ong, K. C, Bullock, C, Keller, S., Tang, M. T., Tso, J. Y., Vasquez, M., and Tsurushita, N. (2004) *J Biol Chem* **279**, 6213-6216
4. Shields, R. L., Namenuk, A. K., Hong, K., Meng, Y. G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., Fox, J. A., and Presta, L. G. (2001) *J Biol Chem* **276**, 6591-6604
5. Dall'Acqua, W. F., Woods, R. M., Ward, E. S., Palaszynski, S. R., Patel, N. K., Brewah, Y.
- 15 A., Wu, H., Kiener, P. A., and Langermann, S. (2002) *J Immunol* **169**, 5171-5180
6. Johnsson, B., Lofas, S., and Lindquist, G. (1991) *Anal Biochem* **198**, 268-277
7. Karlsson, R., Michaelsson, A., and Mattsson, L. (1991) *J Immunol Methods* **145**, 229-240
8. IAcore, Inc. (1991) *BIAcore Methods Manual*, Piscataway, NJ
- 20 9. Martin, W. L., West, A. P., Jr., Can, L., and Bjorkman, P. J. (2001) *Mol Cell* **7**, 867-877
10. Burmeister, W. P., Huber, A. H., and Bjorkman, P. J. (1994) *Nature* **372**, 379-383

Ссылки

Работы, цитируемые в настоящей заявке, включая патенты, патентные публикации и другие публикации, вводятся в настоящее описание посредством ссылки.

25 Настоящее изобретение может быть осуществлено, если это не оговорено особо, с применением стандартных методов молекулярной биологии и т.п., известных специалистам. Такие методы хорошо описаны в литературе. См., например, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (J. Sambrook *et al*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989); Current Protocols in Molecular Biology (F. Ausubel *et al.*, eds., 1987 updated); Essential Molecular Biology (T. Brown ed., IRL Press 1991); Gene Expression Technology (Goeddel ed., Academic Press 1991); Methods for Cloning and Analysis of Eukaryotic Genes (A. Bothwell *et al.* eds., Bartlett Publ. 1990); Gene Transfer and Expression (M. Krieglner, Stockton Press 1990); Recombinant DNA Methodology II (R. Wu *et al.* eds., Academic Press 1995); PCR: A Practical Approach (M. McPherson *et al.*, IRL Press at Oxford University Press 1991); Oligonucleotide Synthesis (M. Gait ed., 1984); Cell Culture for Biochemists (R. Adams ed., Elsevier Science Publishers 1990); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. Miller & M. Calos eds., 1987); Mammalian Cell Biotechnology (M. Butler ed., 1991); Animal Cell Culture (J. Pollard *et al.* eds., Humana Press 1990); Culture of Animal Cells. 2nd Ed. (R. Freshney *et al.* eds., Alan R. Liss 1987); Flow Cytometry and Sorting (M. Melamed *et al.* eds., Wiley-Liss 1990); the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Wirth M. and Hauser H. (1993); Immunochemistry in Practice. 3rd edition, A. Johnstone & R. Thorpe, Blackwell Science, Cambridge, MA, 1996; Techniques in

45 Immunocytochemistry. (G. Bullock & P. Petrusz eds., Academic Press 1982, 1983, 1985, 1989); Handbook of Experimental Immunology, (D. Weir & C. Blackwell, eds.); Current Protocols in Immunology (J. Coligan *et al.* eds. 1991); Immunoassay (E. P. Diamandis & T.K. Christopoulos, eds., Academic Press, Inc., 1996); Coding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2d ed) Academic Press, New York; Ed Harlow and David Lane, Antibodies A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1988; Antibody Engineering. 2nd edition (C. Borrebaeck, ed., Oxford University Press, 1995); and the series Annual Review of Immunology; the series Advances in Immunology.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Genentech, Inc.

<120> ПОЛИПЕПТИДНЫЕ ВАРИАНТЫ С ИЗМЕНЕННОЙ ЭФФЕКТОРНОЙ ФУНКЦИЕЙ

5 <130> P2158R1PCT

<140> PCT/US2005/029511
<141> 2005-08-19

<150> US 60/603,057
10 <151> 2004-08-19

<160> 54

<210> 1
<211> 107
<212> PRT
15 <213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная последовательность

<400> 1

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
20 25 30

Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro
25 35 40 45

Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
50 55 60

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

30 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
80 85 90

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
95 100 105

35 Lys Arg

<210> 2
<211> 122
<212> PRT
40 <213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная последовательность

<400> 2

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

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

50

Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45

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

5 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
 65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

10 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
 95 100 105

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 110 115 120

15 Ser Ser

<210> 3
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

20 <220>
 <223> Синтезированная последовательность

<400> 3
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

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

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

30 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

35 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90

Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

Ile Lys

40 <210> 4
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

45 <220>
 <223> Синтезированная последовательность

<400> 4
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

50

RU 2 367 667 C2

1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
 20 25 30
 5 Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr
 50 55 60
 10 Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr
 95 100 105
 15 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115

<210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 20 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтезированная последовательность

<400> 5
 25 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn
 20 25 30
 30 Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 35 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 40 Ile Lys

<210> 6
 <211> 120
 <212> PRT
 45 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтезированная последовательность

50

<400> 6

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
 20 25 30

5

Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45

Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr
 50 55 60

10

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
 65 70 75

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

15

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr
 95 100 105

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120

<210> 7

20

<211> 108

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная последовательность

25

<400> 7

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu
 1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Ile Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser
 20 25 30

30

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys
 35 40 45

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

35

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

Ser Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90

40

Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 8

45

<211> 123

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

50

<223> Синтезированная последовательность

<400> 8

Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 5 Glu Thr Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 10 Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr
 50 55 60
 Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Glu Thr Ser
 65 70 75
 15 Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Asp Asp
 80 85 90
 Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser
 95 100 105
 Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr
 110 115 120
 20 Val Ser Ser

<210> 9

<211> 108

<212> PRT

25 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная последовательность

<400> 9

30 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser
 20 25 30
 35 Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 40 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 45 Ile Lys Arg

<210> 10

50

<211> 123
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтезированная последовательность

5

<400> 10

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

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

10

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

Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr
 50 55 60

15

Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser
 65 70 75

Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

20

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser
 95 100 105

Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 110 115 120

25

Val Ser Ser

<210> 11
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

30

<220>
 <223> Синтезированная последовательность

<400> 11

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

35

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

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

40

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

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

45

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90

Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

50

Ile Lys Arg

<210> 12
 <211> 123
 5 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтезированная последовательность

 10 <400> 12
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr
 20 25 30
 15 His Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr
 50 55 60
 20 Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser
 65 70 75
 Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 25 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr
 95 100 105
 Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 110 115 120
 30 Val Ser Ser

<210> 13
 <211> 108
 35 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтезированная последовательность

 40 <400> 13
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Thr Ile Ser
 20 25 30
 45 Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 50 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90

His Asn Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

5 Ile Lys Arg

<210> 14

<211> 121

<212> PRT

10 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная последовательность

<400> 14

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

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

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

Glu Trp Val Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Tyr
 50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
 65 70 75

25 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ile Tyr Phe Tyr Gly Thr
 95 100 105

30 Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 110 115 120

Ser

<210> 15

35 <211> 214

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная последовательность

40 <400> 15

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Thr Ile Ser
 20 25 30

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

Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser

50

	50		55		60
	Arg Phe Ser Gly	Ser Gly Ser Gly Thr	Asp Phe Thr Leu Thr	Ile	
	65		70	75	
5	Ser Ser Leu Gln	Pro Glu Asp Phe Ala	Thr Tyr Tyr Cys Gln	Gln	
	80		85	90	
	His Asn Glu Tyr	Pro Leu Thr Phe Gly	Gln Gly Thr Lys Val	Glu	
	95		100	105	
10	Ile Lys Arg Thr	Val Ala Ala Pro Ser	Val Phe Ile Phe Pro	Pro	
	110		115	120	
	Ser Asp Glu Gln	Leu Lys Ser Gly Thr	Ala Ser Val Val Cys	Leu	
	125		130	135	
	Leu Asn Asn Phe	Tyr Pro Arg Glu Ala	Lys Val Gln Trp Lys	Val	
	140		145	150	
15	Asp Asn Ala Leu	Gln Ser Gly Asn Ser	Gln Glu Ser Val Thr	Glu	
	155		160	165	
	Gln Asp Ser Lys	Asp Ser Thr Tyr Ser	Leu Ser Ser Thr Leu	Thr	
	170		175	180	
20	Leu Ser Lys Ala	Asp Tyr Glu Lys His	Lys Val Tyr Ala Cys	Glu	
	185		190	195	
	Val Thr His Gln	Gly Leu Ser Ser Pro	Val Thr Lys Ser Phe	Asn	
	200		205	210	
25	Arg Gly Glu Cys				
	<210> 16				
	<211> 218				
	<212> PRT				
	<213> Искусственная последовательность				
30	<220>				
	<223> Синтезированная последовательность				
	<400> 16				
35	Asp Ile Gln Leu	Thr Gln Ser Pro Ser	Ser Leu Ser Ala Ser	Val	
	1	5	10	15	
	Gly Asp Arg Val	Thr Ile Thr Cys Arg	Ala Ser Gln Ser Val	Asp	
	20		25	30	
	Tyr Asp Gly Asp	Ser Tyr Met Asn Trp	Tyr Gln Gln Lys Pro	Gly	
	35		40	45	
40	Lys Ala Pro Lys	Leu Leu Ile Tyr Ala	Ala Ser Tyr Leu Glu	Ser	
	50		55	60	
	Gly Val Pro Ser	Arg Phe Ser Gly Ser	Gly Ser Gly Thr Asp	Phe	
	65		70	75	
45	Thr Leu Thr Ile	Ser Ser Leu Gln Pro	Glu Asp Phe Ala Thr	Tyr	
	80		85	90	
	Tyr Cys Gln Gln	Ser His Glu Asp Pro	Tyr Thr Phe Gly Gln	Gly	
	95		100	105	

50

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
 110 115 120
 Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 125 130 135
 5 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
 140 145 150
 Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 155 160 165
 10 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 170 175 180
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 185 190 195
 15 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 200 205 210
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 215
 20 <210> 17
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 25 <220>
 <223> Синтезированная последовательность
 <400> 17
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 30 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Pro Val Asp
 20 25 30
 Gly Glu Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 35 35 40 45
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
 50 55 60
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 65 70 75
 40 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 80 85 90
 Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
 95 100 105
 45 Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
 110 115 120
 Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 125 130 135
 50 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
 140 145 150

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 155 160 165

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 170 175 180

5 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 185 190 195

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 200 205 210

10 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 215

<210> 18
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

15 <220>
 <223> Синтезированная последовательность

<400> 18

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Pro Val Asp
 20 25 30

Gly Glu Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 35 40 45

25 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
 50 55 60

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 65 70 75

30 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 80 85 90

Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
 95 100 105

35 Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
 110 115 120

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 125 130 135

40 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
 140 145 150

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 155 160 165

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 170 175 180

45 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 185 190 195

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

50

200

205

210

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

5 <210> 19
<211> 214
<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная последовательность

10

<400> 19

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

Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly
20 25 30

15

Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
35 40 45

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

20

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

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

25

Ser Asp Ser Trp Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
110 115 120

30

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
125 130 135

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
140 145 150

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
155 160 165

35

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
170 175 180

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
185 190 195

40

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
200 205 210

Arg Gly Glu Cys

45 <210> 20
<211> 451
<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

50

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 320 325 330

5 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 335 340 345

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 350 355 360

10 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 365 370 375

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 380 385 390

15 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 395 400 405

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 410 415 420

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 425 430 435

20 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 440 445 450

Lys

25 <210> 21
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 30 <223> Синтезированная последовательность

<400> 21
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15

35 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
 20 25 30

Ser Gly Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 35 40 45

40 Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr
 50 55 60

Asn Pro Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 65 70 75

Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

45 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His
 95 100 105

Trp His Phe Ala Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

50

RU 2 367 667 C2

	110		115		120
	Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser				
	125		130		135
5	Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val				
	140		145		150
	Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly				
	155		160		165
10	Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser				
	170		175		180
	Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser				
	185		190		195
	Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro				
	200		205		210
15	Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp				
	215		220		225
	Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly				
	230		235		240
20	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu				
	245		250		255
	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val				
	260		265		270
25	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly				
	275		280		285
	Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr				
	290		295		300
30	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln				
	305		310		315
	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys				
	320		325		330
35	Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly				
	335		340		345
	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu				
	350		355		360
	Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly				
	365		370		375
40	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln				
	380		385		390
	Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp				
	395		400		405
45	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg				
	410		415		420
	Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala				
	425		430		435

50

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 440 445 450

Lys

5

<210> 22
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

10

<220>
 <223> Синтезированная последовательность

<400> 22

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

15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
 20 25 30

Ser Gly Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 35 40 45

20

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

Asn Pro Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 65 70 75

25

Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His
 95 100 105

30

Trp His Phe Ala Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 110 115 120

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 125 130 135

35

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 140 145 150

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 155 160 165

40

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 170 175 180

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 185 190 195

45

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 200 205 210

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 215 220 225

50

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

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

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

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

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300

10 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 320 325 330

15 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 335 340 345

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 350 355 360

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 365 370 375

20 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 380 385 390

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 395 400 405

25 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 410 415 420

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 425 430 435

30 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 440 445 450

Lys

35 <210> 23
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтезированная последовательность

40 <400> 23
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 1 5 10 15

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

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

Glu Trp Val Gly Glu Ile Ser Pro Gly Thr Phe Thr Thr Asn Tyr

50

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 380 385 390

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 395 400 405

5 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 410 415 420

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 425 430 435

10 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 440 445 450

Pro Gly Lys

15 <210> 24
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

20 <220>
 <223> Синтезированная последовательность

<400> 24
 Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro
 1 5 10 15

25 Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
 20 25 30

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

30 Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg
 50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
 65 70 75

35 Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 80 85 90

Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Ala Lys Leu Glu Ile
 95 100 105

40 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
 110 115 120

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 125 130 135

45 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 140 145 150

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 155 160 165

50 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
 170 175 180

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
 185 190 195

Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 200 205 210

5 Gly Glu Cys

<210> 25
 <211> 451
 <212> PRT
 10 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтезированная последовательность

<400> 25

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

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

Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu
 20 35 40 45

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

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
 65 70 75

25 Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
 80 85 90

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp
 95 100 105

30 Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 110 115 120

Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 125 130 135

35 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 140 145 150

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 155 160 165

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 170 175 180

40 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 185 190 195

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 200 205 210

45 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 215 220 225

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

50

RU 2 367 667 C2

					230					235				240					
					Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
					245					250				255					
5					Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
					260					265				270					
					Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
					275					280				285					
10					Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
					290					295				300					
					Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln
					305					310				315					
					Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
15					320					325				330					
					Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
					335					340				345					
					Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp
					350					355				360					
20					Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly
					365					370				375					
					Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
					380					385				390					
25					Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
					395					400				405					
					Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
					410					415				420					
30					Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
					425					430				435					
					Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
					440					445				450					
					Lys														
35					<210>					26									
					<211>					213									
					<212>					PRT									
					<213>					Искусственная последовательность									
40					<220>														
					<223>					Синтезированная последовательность									
					<400>					26									
					Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
					1				5					10					15
45					Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser
					20									25					30
					Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Pro
					35									40					45
50																			

Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
 50 55 60
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75
 5 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 80 85 90
 Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 95 100 105
 10 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
 110 115 120
 Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 125 130 135
 15 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 140 145 150
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 155 160 165
 20 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
 170 175 180
 Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
 185 190 195
 25 Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 200 205 210
 Gly Glu Cys
 30 <210> 27
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 35 <220>
 <223> Синтезированная последовательность
 <400> 27
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 40 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 45 Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
 50 55 60
 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
 65 70 75
 50 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
 95 100 105

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 110 115 120

5 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 125 130 135

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 140 145 150

10 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 155 160 165

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 170 175 180

15 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 185 190 195

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 200 205 210

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 215 220 225

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

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

25 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270

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

30 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315

35 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 320 325 330

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 335 340 345

40 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 350 355 360

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 365 370 375

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 380 385 390

45 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 395 400 405

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

50

RU 2 367 667 C2

	410		415		420
	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu				
	425		430		435
5	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		445		450
	Gly Lys				
	<210> 28				
10	<211> 452				
	<212> PRT				
	<213> Искусственная последовательность				
	<220>				
	<223> Синтезированная последовательность				
15	<400> 28				
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly				
	1 5 10 15				
	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr		25		30
	20				
20	Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		40		45
	35				
	Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr		55		60
	50				
25	Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser		70		75
	65				
	Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp		85		90
	80				
30	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser		100		105
	95				
	Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val		115		120
	110				
	Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro		130		135
	125				
35	Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu		145		150
	140				
	Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser		160		165
	155				
40	Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		175		180
	170				
	Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		190		195
	185				
45	Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		205		210
	200				
	Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys		220		225
	215				

50

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 5 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 10 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315
 15 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 320 325 330
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 335 340 345
 20 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 350 355 360
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 365 370 375
 25 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 380 385 390
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 395 400 405
 30 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 410 415 420
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 425 430 435
 35 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 440 445 450
 Gly Lys
 40 <210> 29
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 29
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 1 5 10 15
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 20 25 30
 50 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 35 40 45

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 65 70 75

5 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 80 85 90

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 95 100 105

10 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 110 115 120

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 125 130 135

15 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 140 145 150

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 155 160 165

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 170 175 180

20 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 185 190 195

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 200 205 210

25 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 215

<210> 30
 <211> 218
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens

<400> 30
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 1 5 10 15

35 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 35 40 45

40 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 65 70 75

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 80 85 90

45 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 95 100 105

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

50

					110						115					120
	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
					125						130				135	
5	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	
					140					145					150	
	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	
					155					160					165	
10	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	
					170					175					180	
	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	
					185					190					195	
	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	
					200					205					210	
15	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								
					215											
	<210> 31															
	<211> 217															
	<212> PRT															
20	<213> Homo sapiens															
	<400> 31															
	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
	1				5					10					15	
25	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	
					20					25					30	
	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	
					35					40					45	
30	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	
					50					55					60	
	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	
					65					70					75	
	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	
					80					85					90	
35	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	
					95					100					105	
	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	
					110					115					120	
40	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
					125					130					135	
	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
					140					145					150	
45	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	
					155					160					165	
	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	
					170					175					180	

50

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 185 190 195

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 200 205 210

5 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 215

<210> 32
 <211> 218
 <212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 32
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 1 5 10 15

15 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
 35 40 45

20 Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
 65 70 75

25 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 80 85 90

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 95 100 105

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 110 115 120

30 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 125 130 135

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 140 145 150

35 Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr
 155 160 165

Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 170 175 180

40 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser
 185 190 195

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys
 200 205 210

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 215

45 <210> 33
 <211> 218
 <212> PRT

50

<213> Homo sapiens

<400> 33

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

<210> 34

<211> 215

<212> PRT

<213> Mus musculus

40

<400> 34

Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val
 20 25 30
 45 Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp
 35 40 45
 Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg
 50

					50					55					60
	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Ser	Val	Ser	Glu	Leu	Pro
					65					70					75
5	Ile	Met	His	Gln	Asp	Cys	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Arg
					80					85					90
	Val	Asn	Ser	Ala	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
					95					100					105
10	Lys	Thr	Lys	Gly	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro
					110					115					120
	Pro	Pro	Lys	Glu	Gln	Met	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
					125					130					135
15	Met	Ile	Thr	Asp	Phe	Phe	Pro	Glu	Asp	Ile	Thr	Val	Glu	Trp	Gln
					140					145					150
	Trp	Asn	Gly	Gln	Pro	Ala	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Gln	Pro	Ile
					155					160					165
	Met	Asp	Thr	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Val	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn	Val
					170					175					180
20	Gln	Lys	Ser	Asn	Trp	Glu	Ala	Gly	Asn	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Val
					185					190					195
	Leu	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Glu	Lys	Ser	Leu	Ser
					200					205					210
25	His	Ser	Pro	Gly	Lys										
					215										
	<210>				35										
	<211>				218										
	<212>				PRT										
	<213>				Mus musculus										
30	<400>				35										
	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro
	1				5					10					15
	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu	Ser	Pro	Ile	Val
35					20					25					30
	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Gln
					35					40					45
	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr
					50					55					60
40	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val	Ser
					65					70					75
	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe
					80					85					90
45	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Arg
					95					100					105
	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr
					110					115					120
50															

Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr
 125 130 135

Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val
 140 145 150

5 Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr
 155 160 165

Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys
 170 175 180

10 Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser
 185 190 195

Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys
 200 205 210

15 Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 215

<210> 36
 <211> 218
 20 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 36
 Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 1 5 10 15

25 Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val
 20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln
 35 40 45

30 Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
 50 55 60

Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser
 65 70 75

35 His Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
 80 85 90

Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg
 95 100 105

40 Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr
 110 115 120

Thr Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser
 125 130 135

45 Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val
 140 145 150

Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr
 155 160 165

50 Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys
 170 175 180

Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser
 185 190 195

Cys Asn Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys
 200 205 210

5 Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 215

<210> 37
 <211> 218
 <212> PRT
 10 <213> Mus musculus

<400> 37
 Pro Pro Gly Asn Ile Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 1 5 10 15

15 Pro Lys Pro Lys Asp Ala Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val
 20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val His
 35 40 45

20 Val Ser Trp Phe Val Asp Asn Lys Glu Val His Thr Ala Trp Thr
 50 55 60

Gln Pro Arg Glu Ala Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
 65 70 75

25 Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Arg Gly Lys Glu Phe
 80 85 90

Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg
 95 100 105

Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Arg Ala Gln Thr Pro Gln Val Tyr
 110 115 120

30 Thr Ile Pro Pro Pro Arg Glu Gln Met Ser Lys Lys Lys Val Ser
 125 130 135

Leu Thr Cys Leu Val Thr Asn Phe Phe Ser Glu Ala Ile Ser Val
 140 145 150

35 Glu Trp Glu Arg Asn Gly Glu Leu Glu Gln Asp Tyr Lys Asn Thr
 155 160 165

Pro Pro Ile Leu Asp Ser Asp Gly Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys
 170 175 180

40 Leu Thr Val Asp Thr Asp Ser Trp Leu Gln Gly Glu Ile Phe Thr
 185 190 195

Cys Ser Val Val His Glu Ala Leu His Asn His His Thr Gln Lys
 200 205 210

Asn Leu Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 215

45 <210> 38
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50

<400> 38
 Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 1 5 10 15
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 20 30
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 35 40 45
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 50 55 60
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 65 70 75
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 80 85 90
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 95 100 105
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 110 115 120
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 125 130 135
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 140 145 150
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 155 160 165
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 170 175 180
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 185 190 195
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 200 205 210
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Leu
 215 220

35 <210> 39
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 40 <223> Синтезированная последовательность

<400> 39
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
 20 25 30
 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro
 35 40 45

50

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Ala Ser
 95 100 105
 Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 110 115 120
 5 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 125 130 135
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 140 145 150
 10 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 155 160 165
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 170 175 180
 15 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 185 190 195
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 200 205 210
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 215 220 225
 20 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 25 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 30 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315
 35 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 320 325 330
 Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 335 340 345
 40 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 350 355 360
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 365 370 375
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 380 385 390
 45 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 395 400 405
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

50

		410		415		420													
	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu				
					425					430					435				
5	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro				
					440					445					450				
	Gly	Lys																	
	<210>	41																	
10	<211>	107																	
	<212>	PRT																	
	<213>	Искусственная последовательность																	
	<220>																		
	<223>	Синтезированная последовательность																	
15	<400>	41																	
	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val				
	1				5					10					15				
	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser				
					20					25					30				
20	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Pro				
					35					40					45				
	Leu	Ile	Tyr	Ala	Pro	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg				
					50					55					60				
25	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser				
					65					70					75				
	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp				
					80					85					90				
30	Ala	Phe	Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile				
					95					100					105				
	Lys	Arg																	
	<210>	42																	
35	<211>	122																	
	<212>	PRT																	
	<213>	Искусственная последовательность																	
	<220>																		
	<223>	Синтезированная последовательность																	
40	<400>	42																	
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly				
	1				5					10					15				
	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr				
					20					25					30				
45	Ser	Tyr	Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu				
					35					40					45				
	Glu	Trp	Val	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Ala	Thr	Ser	Tyr				
					50					55					60				
50																			

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 5 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Ala Ser
 95 100 105
 Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 110 115 120
 10 Ser Ser

 <210> 43
 <211> 452
 15 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтезированная последовательность

 20 <400> 43
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 25 Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
 50 55 60
 30 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 35 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Ala Ser
 95 100 105
 Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 110 115 120
 40 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 125 130 135
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 140 145 150
 45 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 155 160 165
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 170 175 180
 50 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 185 190 195

RU 2 367 667 C2

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 200 205 210

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 215 220 225

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

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

10 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270

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

15 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300

Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 320 325 330

20 Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 335 340 345

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 350 355 360

25 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 365 370 375

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 380 385 390

30 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 395 400 405

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 410 415 420

35 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 425 430 435

Ala Leu His Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 440 445 450

Gly Lys

40 <210> 44
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

45 <220>
 <223> Синтезированная последовательность

<400> 44
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

50

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 335 340 345

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 350 355 360

5 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 365 370 375

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 380 385 390

10 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 395 400 405

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 410 415 420

15 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 425 430 435

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 440 445 450

20 Gly Lys

<210> 45
 <211> 122
 25 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтезированная последовательность

30 <400> 45
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15

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

35 Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45

Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
 50 55 60

40 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
 65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

45 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg
 95 100 105

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 110 115 120

50 Ser Ser

<210> 46
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 5 <223> Синтезированная последовательность

<400> 46

	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
	1				5					10					15
10	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr
					20					25					30
	Ser	Tyr	Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
					35					40					45
15	Glu	Trp	Val	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Ala	Thr	Ser	Tyr
					50					55					60
	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser
					65					70					75
20	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
					80					85					90
	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Arg
					95					100					105
	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
					110					115					120
25	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro
					125					130					135
	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
					140					145					150
30	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
					155					160					165
	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
					170					175					180
35	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
					185					190					195
	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
					200					205					210
40	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
					215					220					225
	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
					230					235					240
	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
					245					250					255
45	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
					260					265					270
	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp

50

RU 2 367 667 C2

	275		280		285
	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln				
	290		295		300
5	Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His				
	305		310		315
	Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn				
	320		325		330
10	Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys				
	335		340		345
	Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg				
	350		355		360
	Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys				
	365		370		375
15	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly				
	380		385		390
	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser				
	395		400		405
20	Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser				
	410		415		420
	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu				
	425		430		435
25	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro				
	440		445		450
	Gly Lys				
	<210> 47				
30	<211> 111				
	<212> PRT				
	<213> Искусственная последовательность				
	<220>				
	<223> Синтезированная последовательность				
35	<400> 47				
	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val				
	1 5 10 15				
	Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp				
	20 25 30				
40	Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly				
	35 40 45				
	Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser				
	50 55 60				
45	Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe				
	65 70 75				
	Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr				
	80 85 90				

50

Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
 95 100 105

Thr Lys Val Glu Ile Lys
 110

5

<210> 48
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

10

<220>
 <223> Синтезированная последовательность

<400> 48

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

15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
 20 25 30

Ser Gly Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 35 40 45

20

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

Asn Pro Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 65 70 75

25

Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His
 95 100 105

30

Trp His Phe Ala Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 110 115 120

Ser

35

<210> 49
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

40

<220>
 <223> Синтезированная последовательность

<400> 49

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

45

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Pro Val Asp
 20 25 30

Gly Glu Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 35 40 45

50

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

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
65 70 75

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
80 85 90

5 Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
95 100 105

Thr Lys Val Glu Ile Lys
110

10 <210> 50
<211> 121
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтезированная последовательность

15 <400> 50
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
20 20 25 30

20 Ser Gly Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
35 40 45

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

25 Asn Pro Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

30 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His
95 100 105

Trp His Phe Ala Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
110 115 120

35 Ser

<210> 51
<211> 111
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

40 <220>
<223> Синтезированная последовательность

<400> 51
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

45 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Pro Val Asp
20 25 30

Gly Glu Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly

50

		35		40		45									
	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Tyr	Leu	Glu	Ser
					50					55				60	
5	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
					65					70				75	
	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr
					80					85				90	
10	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly
					95					100				105	
	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys									
					110										
	<210>	52													
	<211>	121													
15	<212>	PRT													
	<213>	Искусственная последовательность													
	<220>														
	<223>	Синтезированная последовательность													
	<400>	52													
20	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
	1				5					10				15	
	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr
					20					25				30	
25	Ser	Gly	Tyr	Ser	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly
					35					40				45	
	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Ser	Ile	Lys	Tyr	Ser	Gly	Glu	Thr	Lys	Tyr
					50					55				60	
30	Asn	Pro	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Ile	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser
					65					70				75	
	Lys	Asn	Thr	Phe	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
					80					85				90	
35	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Ser	His	Tyr	Phe	Gly	His
					95					100				105	
	Trp	His	Phe	Ala	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
					110					115				120	
	Ser														
40	<210>	53													
	<211>	111													
	<212>	PRT													
	<213>	Искусственная последовательность													
	<220>														
45	<223>	Синтезированная последовательность													
	<400>	53													
	Asp	Ile	Leu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
	1				5					10				15	
50															

выбранных из группы, состоящей из D265A, S298A/E333A/K334A, K334L, K322A, K326A, K326W, E380A и E380A/T307A, сообщающих указанному полипептиду по меньшей мере одно из нижеследующих свойств, выбранных из таких свойств, как

5 повышенный уровень связывания с FcγR, повышенная антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), повышенная комплементзависимая цитотоксичность (CDC),

10 пониженная CDC, повышенная ADCC- и CDC-функции, повышенная ADCC, но при этом пониженная CDC-функция, повышенный уровень связывания с FcRn и более продолжительное время полужизни в сыворотке, по сравнению с полипептидом,

имеющим Fc-область с нативной последовательностью,

где указанные остатки пронумерованы в соответствии с Европейской нумерацией по Кэбату и

где полипептид обладает повышенной связывающей аффинностью в отношении FcRn по сравнению с полипептидом, имеющим Fc-область с нативной

15 последовательностью.

2. Полипептид по п.1, где указанный Fc-вариант связывается с FcRn человека при pH 6,0 с более высокой аффинностью, чем Fc-область IgG с нативной последовательностью, и где указанный вариант связывается при pH 7,4 с меньшей

20 аффинностью, чем при pH 6,0.

3. Полипептид по п.2, где указанная аффинность связывания с FcRn человека при pH 6,0 по меньшей мере в 20 раз превышает аффинность связывания Fc-области с нативной последовательностью.

4. Полипептид по п.1, где время полужизни указанного полипептида в сыворотке у

25 приматов выше, чем у полипептида, содержащего Fc-область с нативной последовательностью.

5. Полипептид по п.4, где указанным приматом является человек или

сбакоподобная обезьяна.

6. Полипептид по п.1, где указанным полипептидом является иммуноадгезин.

7. Выделенное антитело, которое содержит вариант Fc-области IgG, содержащий по

30 меньшей мере одну аминокислотную замену Asn434 на Trp (N434W),

где указанное антитело, необязательно, дополнительно содержит одну или

несколько аминокислотных замен в Fc-области IgG в положениях остатков,

35 выбранных из группы, состоящей из D265A, S298A/E333A/K334A, K334L, K322A, K326A, K326W, E380A и E380A/T307A, сообщающих указанному антителу по меньшей мере одно из нижеследующих свойств, выбранных из таких свойств, как повышенный уровень связывания с FcγR, повышенная антителозависимая клеточная

40 цитотоксичность (ADCC), повышенная комплементзависимая цитотоксичность (CDC), пониженная CDC, повышенная ADCC- и CDC-функции, повышенная ADCC-, но при этом пониженная CDC-функция, повышенный уровень связывания с FcRn и более продолжительное время полужизни в сыворотке по сравнению с антителом,

имеющим Fc-область с нативной последовательностью,

45 где указанные остатки пронумерованы в соответствии с Европейской нумерацией по Кэбату и

где полипептид обладает повышенной связывающей аффинностью в отношении FcRn по сравнению с полипептидом, имеющим Fc-область с нативной

50 последовательностью.

8. Антитело по п.7, где указанный Fc-вариант IgG связывается с FcRn человека при pH 6,0 с более высокой аффинностью, чем Fc-область IgG с нативной последовательностью, и где указанный вариант связывается при pH 7,4 с меньшей

аффинностью, чем при рН 6,0.

9. Антитело по п.8, где указанная аффинность связывания Fc-варианта с FcRn человека при рН 6,0 по меньшей мере в 20 раз превышает аффинность связывания Fc-области IgG с нативной последовательностью.

10. Антитело по п.7, где указанное антитело является химерным, гуманизованным или человеческим.

11. Антитело по п.10, где указанное антитело представляет собой IgG1.

12. Антитело по п.7, где указанное антитело связывается с антигеном, выбранным из группы, состоящей из CD20, Her2, BR3, TNF, VEGF, IgE и CD11a.

13. Антитело по п.12, где указанное антитело связывается с CD20 человека и содержит последовательность v_H , выбранную из группы, состоящей из последовательностей

a. SEQ ID NO:2;

b. SEQ ID NO:42 и

c. SEQ ID NO:45,

и где L-цепь содержит последовательность v_L SEQ ID NO:1 или полную последовательность SEQ ID NO:26.

14. Антитело по п.12, где указанное антитело связывается с CD20 человека и содержит последовательность v_L C2B8 SEQ ID NO:24 и последовательность v_H C2B8 SEQ ID NO:25, которые представлены на фиг.10.

15. Антитело по п.12, где указанное антитело связывается с VEGF и содержит последовательности v_L и v_H , выбранные из группы, состоящей из последовательностей v_L SEQ ID NO:7 и v_H SEQ ID NO:8;

последовательностей v_L SEQ ID NO:9 и v_H SEQ ID NO:10; и последовательностей v_L SEQ ID NO: 11 и v_H SEQ ID NO:12.

16. Антитело по п.12, где указанное антитело связывается с Her2 и содержит последовательности v_L и v_H , выбранные из группы, состоящей из последовательностей v_L SEQ ID NO:3 и v_H SEQ ID NO:4 и последовательностей v_L SEQ ID NO:5 и v_H SEQ ID NO:6.

17. Антитело по п.12, где указанное антитело связывается с CD11a человека и содержит последовательность v_L SEQ ID NO:13 или полную последовательность L-цепи SEQ ID NO:15 и последовательность v_H SEQ ID NO:14.

18. Антитело по п.12, где указанное антитело связывается с IgE человека и содержит последовательности v_L и v_H , выбранные из группы, состоящей из последовательностей v_L SEQ ID NO:47 и v_H SEQ ID NO:48;

последовательностей v_L SEQ ID NO:49 и v_H SEQ ID NO:50;

последовательностей v_L SEQ ID NO:51 и v_H SEQ ID NO:52 и последовательностей v_L SEQ ID NO:53 и v_H SEQ ID NO:54.

19. Композиция для нацеливания антитела на антиген, содержащая полипептид по любому из пп.1-6 или антитело по любому из пп.7-18 и носитель.

20. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по любому из пп.1-6 или антитело по любому из пп.7-18.

21. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид по любому из пп.1-6 или антитело по любому из пп.7-18.

22. Выделенная клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.20,

предназначенная для продукции вектора, содержащего эту нуклеиновую кислоту.

23. Выделенная клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.20, где клетка-хозяин продуцирует полипептид или антитело, кодирующее нуклеиновую кислоту.

24. Способ получения полипептида или антитела, включающий культивирование клетки-хозяина по п.23, продуцирующей указанный полипептид или антитело, и выделение указанного полипептида или антитела из клеточной культуры.

25. Промышленное изделие, содержащее контейнер и содержащуюся в нем композицию для терапевтического применения, где указанная композиция содержит полипептид по любому из пп.1-6 или антитело по любому из пп.7-18.

26. Промышленное изделие по п.25, которое дополнительно содержит вкладыш, на котором указано, что такая композиция может быть использована для лечения неходжкинской лимфомы.

27. Способ лечения В-клеточной опухоли или злокачественного заболевания, характеризующихся экспрессией CD20 В-клетками, где указанный способ включает введение пациенту, страдающему указанным опухолевым или злокачественным заболеванием, терапевтически эффективного количества гуманизированного CD20-связывающего антитела по п.13 или 14.

28. Способ по п.27, где указанной В-клеточной опухолью является неходжкинская лимфома (НХЛ) или лимфоцитарная болезнь Ходжкина (ЛБХ).

29. Способ лечения хронического лимфоцитарного лейкоза, включающий введение пациенту, страдающему таким лейкозом, терапевтически эффективного количества антитела по п.13 или 14.

30. Способ ослабления симптомов В-клеточного регулируемого аутоиммунного заболевания, включающий введение пациенту, страдающему указанным заболеванием, терапевтически эффективного количества CD20-связывающего антитела по п.13 или 14.

31. Способ по п.30, где указанное аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из ревматоидного артрита, юношеского ревматоидного артрита, системной красной волчанки (СКВ), болезни Вегенера, воспалительного заболевания кишечника, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (ИТП), тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП), аутоиммунной тромбоцитопении, рассеянного склероза, псориаза, IgA-нефропатии, IgM-полиневропатии, тяжелой миастении, васкулита, сахарного диабета, синдрома Рейно, синдрома Сьегрена и гломерулонефрита.

32. Способ лечения расстройства, связанного с ангиогенезом, включающий введение пациенту, страдающему указанным расстройством, терапевтически эффективного количества антитела по п.15.

33. Способ лечения HER2-экспрессирующей раковой опухоли, включающий введение пациенту, страдающему указанным расстройством, терапевтически эффективного количества антитела по п.16.

34. Способ лечения LFA-1-опосредуемого расстройства, включающий введение пациенту, страдающему указанным раковым заболеванием, терапевтически эффективного количества антитела по п.17.

35. Способ лечения IgE-опосредуемого расстройства, включающий введение пациенту, страдающему указанным расстройством, терапевтически эффективного количества антитела по п.18.

36. Выделенный антителоподобный полипептид или антитело с вариантом

Fc-области IgG, которые содержат вариант Fc-области IgG, содержащий по меньшей мере одну аминокислотную замену Asn434 на Tyr (N434Y), где указанный полипептид или антитело не имеет дополнительных аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из H433R, H433S, Y436H, Y436R, Y436T,

где полипептид или антитело, необязательно, дополнительно содержат одну или несколько аминокислотных замен в Fc-области IgG в положениях остатков, выбранных из группы, состоящей из D265A, S298A/E333A/K334A, K334L, K322A, K326A, K326W, E380A и E380A/T307A, сообщающих указанному полипептиду или антителу по меньшей мере одно из нижеследующих свойств, выбранных из таких свойств, как повышенный уровень связывания с FcγR, повышенная ADCC, повышенная CDC, пониженная CDC, повышенная ADCC- и CDC-функции, повышенная ADCC-, но при этом пониженная CDC-функция по сравнению с антителом, имеющим Fc-область с нативной последовательностью,

где указанные остатки пронумерованы в соответствии с Европейской нумерацией по Кэбату и

где полипептид или антитело обладает повышенной связывающей аффинностью в отношении FcRn по сравнению с полипептидом или антителом, имеющими Fc-область с нативной последовательностью.

37. Выделенный антителоподобный полипептид или антитело с вариантом Fc-области IgG, которые содержат вариант Fc-области IgG, содержащий по меньшей мере одну аминокислотную замену Asn434 на Phe (N434F), где указанный полипептид или антитело не имеет дополнительных аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из H433K, Y436H, M252Y, S254T или T256E,

где полипептид или антитело, необязательно, дополнительно содержит одну или несколько аминокислотных замен в Fc-области IgG в положениях остатков, выбранных из группы, состоящей из D265A, S298A/E333A/K334A, K334L, K322A, K326A, K326W, E380A и E380A/T307A, сообщающих указанному полипептиду по меньшей мере одно из нижеследующих свойств, выбранных из таких свойств, как повышенный уровень связывания с FcγR, повышенная ADCC, повышенная CDC, пониженная CDC, повышенная ADCC- и CDC-функции, повышенная ADCC-, но при этом пониженная CDC-функция по сравнению с антителом, имеющим Fc-область с нативной последовательностью,

где указанные остатки пронумерованы в соответствии с Европейской нумерацией по Кэбату и

где полипептид или антитело обладает повышенной связывающей аффинностью в отношении FcRn по сравнению с полипептидом или антителом, имеющими Fc-область с нативной последовательностью.

38. Выделенный антителоподобный полипептид или антитело с вариантом Fc-области IgG, которые содержат вариант Fc-области IgG, содержащий по меньшей мере одну аминокислотную замену Asn434 на His (N434H), и, необязательно,

1) где полипептид или антитело дополнительно содержит одну или несколько аминокислотных замен в Fc-области IgG в положениях остатков, выбранных из группы, состоящей из D265A, S298A/E333A/K334A, K334L, K322A, K326A, K326W, E380A и E380A/T307A, сообщающих указанному полипептиду по меньшей мере одно из нижеследующих свойств, выбранных из таких свойств, как повышенный уровень связывания с FcγR, повышенная антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), повышенная комплементзависимая цитотоксичность (CDC), пониженная CDC, повышенная ADCC- и CDC-функции, повышенная ADCC-, но при

этом пониженная CDC-функция, повышенный уровень связывания с FcRn и более продолжительное время полужизни в сыворотке по сравнению с полипептидом или антителом, имеющим Fc-область с нативной последовательностью,

2) где полипептид или антитело дополнительно содержит аминокислотные замены T307A/E380A в Fc-области IgG или

3) где полипептид или антитело дополнительно содержит аминокислотные замены T289H или N315H,

где указанные остатки пронумерованы в соответствии с Европейской нумерацией по Кэбату и

где полипептид или антитело обладает повышенной связывающей аффинностью в отношении FcRn по сравнению с полипептидом или антителом, имеющим Fc-область с нативной последовательностью.

39. Полипептид или антитело по любому из пп.36-38, где указанный вариант Fc-области IgG связывается с FcRn человека при pH 6,0 с более высокой аффинностью, чем Fc-область IgG с нативной последовательностью, и где указанный вариант связывается при pH 7,4 с меньшей аффинностью, чем при pH 6,0.

40. Полипептид или антитело по любому из пп.36-38, где антитело является химерным, человеческим или гуманизованным.

41. Полипептид или антитело по п.40, где указанным IgG является IgG1 человека.

42. Полипептид или антитело по любому из пп.36-38, где указанное антитело связывается с антигеном, выбранным из группы, состоящей из CD20, Her2, BR3, TNF, VEGF, IgE и CD11a.

43. Полипептид или антитело по п.38, где указанное антитело связывается с Her2.

44. Полипептид или антитело по п.43, где указанное антитело содержит последовательности v_L и v_H , выбранные из группы, состоящей из последовательности v_L SEQ ID NO:3, связанной с последовательностью v_H SEQ ID NO:4; и последовательности v_L SEQ ID NO:5, связанной с последовательностью v_H SEQ ID NO:6.

45. Полипептид или антитело по п.38, где указанное антитело содержит последовательность v_L SEQ ID NO:5, связанную с последовательностью v_H SEQ ID NO:6, и где уровень связывания антитела с FcRn человека при pH 6,0 по меньшей мере в 40 раз превышает уровень связывания родительского антитела трастузумаба.

46. Полипептид или антитело по любому из пп.36-38, где указанным полипептидом является иммуноадгезин.

47. Композиция для нацеливания антитела на антиген, содержащая полипептид или антитело по любому из пп.36-38 и 43 и носитель.

48. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид или антитело по любому из пп.36-38 и 43.

49. Выделенная клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.48, предназначенная для продукции вектора, содержащего эту нуклеиновую кислоту.

50. Выделенная клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.48, где клетка-хозяин продуцирует полипептид или антитело, кодирующее нуклеиновую кислоту.

51. Способ получения полипептида, включающий культивирование клетки-хозяина по п.50, которая продуцирует полипептид или антитело, кодируемые нуклеиновой кислотой, и выделение указанного полипептида или антитела из клеточной культуры.

52. Промышленное изделие, содержащее контейнер и содержащуюся в нем

композицию, где указанная композиция содержит полипептид или антитело по любому из пп.36-38 и 43.

53. Способ лечения HER2-экспрессирующей раковой опухоли, включающий введение пациенту, страдающему указанным раковым заболеванием, терапевтически эффективного количества антитела по п.43.

54. Способ по п.53, где указанное антитело содержит последовательности v_L и v_H , выбранные из группы, состоящей из последовательности v_L SEQ ID NO:3, связанной с последовательностью v_H SEQ ID NO:4; и последовательности v_L SEQ ID NO:5, связанной с последовательностью v_H SEQ ID NO:6.

55. Гуманизованное CD20-связывающее антитело, которое содержит последовательность L-цепи SEQ ID NO:39 и последовательность H-цепи SEQ ID NO:40, и вариант Fc-области, содержащий по меньшей мере одну замену N434W, N434Y, N434F или N434A,

где указанные остатки пронумерованы в соответствии с Европейской нумерацией по Кэбату и

где антитело обладает повышенной связывающей аффинностью в отношении FcRn по сравнению с антителом, имеющим Fc-область с нативной последовательностью.

56. Композиция для нацеливания антитела на антиген, содержащая антитело по п.55 и носитель.

57. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по п.55.

58. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.57, предназначенная для клонирования нуклеиновой кислоты.

59. Способ лечения В-клеточной опухоли или злокачественного заболевания, характеризующихся экспрессией CD20 В-клетками, где указанный способ включает введение пациенту, страдающему указанным опухолевым или злокачественным заболеванием, терапевтически эффективного количества гуманизованного CD20-связывающего антитела по п.55.

60. Выделенное анти-HER2 антитело, содержащее вариант Fc-области IgG, содержащий по меньшей мере одну аминокислотную замену Asn 434 на Ala (N434A), и последовательность v_L SEQ ID NO:5, последовательность v_H SEQ ID NO:6,

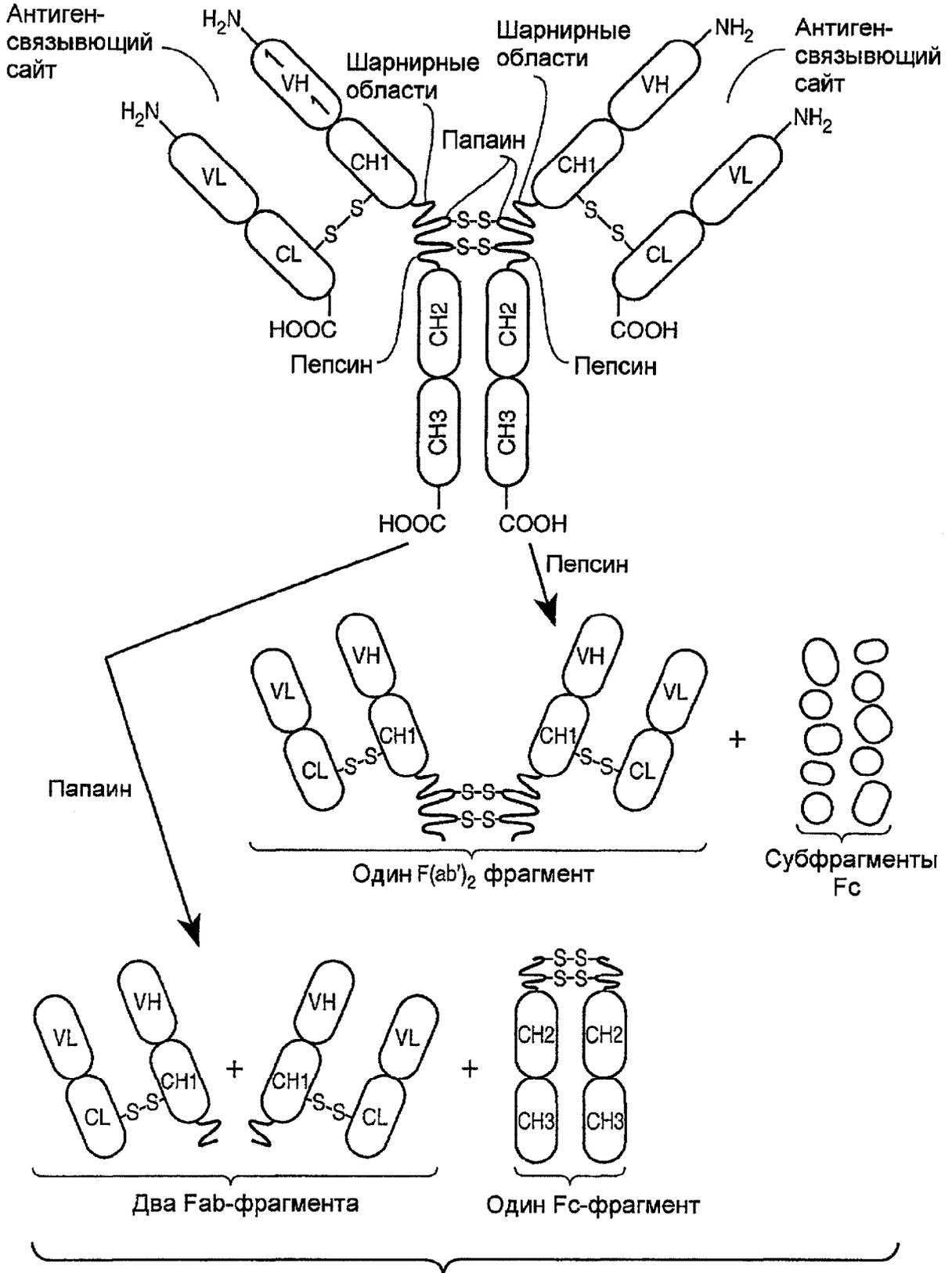
где указанные остатки пронумерованы в соответствии с Европейской нумерацией по Кэбату и

где антитело обладает повышенной связывающей аффинностью в отношении FcRn по сравнению с антителом, имеющим Fc-область с нативной последовательностью.

61. Антитело по п.60, которое дополнительно содержит одну или несколько аминокислотных замен в Fc-области IgG в положениях остатков, выбранных из группы, состоящей из D265A, S298A/E333A/K334A, K334L, K322A, K326A, K326W, E380A и E380A/T307A, где указанные остатки пронумерованы в соответствии с Европейской нумерацией по Кэбату.

62. Способ ослабления симптомов В-клеточного регулируемого аутоиммунного заболевания, включающий введение пациенту, страдающему указанным заболеванием, терапевтически эффективного количества гуманизованного CD20-связывающего антитела по п.55.

63. Выделенная клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.57, где клетка-хозяин продуцирует полипептид, кодируемый этой нуклеиновой кислотой.



Фиг. 1

Легкая цепь

```

1           15           30           45
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK

46          60          75          90
LLIYSASFLYSGVPSRFRSGSRSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQ

91          105
HYTTPPTFGQGTKVEIK
    
```

Фиг. 2А
Тяжелая цепь

```

1           15           30           45
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGL

46          60          75          90
EHWARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED

91          105          120
TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
    
```

Фиг. 2В
Анти-IgE антитела: легкая цепь

```

                10           20           30           40           50           60           70           80
E25  DIQLTQSPSS LSASVGDRTV ITC[RASQSVYDGDSYM]WY QQKPGKAPKL LIY[AASYLES] GVPSRFRSGSG SGTDFTLTIS
E26  DIQLTQSPSS LSASVGDRTV ITC[RASKPVDGEGDSYLN]WY QQKPGKAPKL LIY[AASYLES] GVPSRFRSGSG SGTDFTLTIS
E27  DIQLTQSPSS LSASVGDRTV ITC[RASKPVDGEGDSYLN]WY QQKPGKAPKL LIY[AASYLES] GVPSRFRSGSG SGTDFTLTIS
Hu-901 DIQLTQSPSS LSASVGDRTV ITC[RASQSVYDGDSYM]WY QQKPGKAPKL LIY[AASYLES] GVPSRFRSGSG SGTDFTLTIS
    
```

```

                90           100           110           CL starts
E25  SLQPEDFATY YC[QSHEDPYT]FGQGTKVEI KRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
E26  SLQPEDFATY YC[QSHEDPYT]FGQGTKVEI KRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
E27  SLQPEDFATY YC[QSHEDPYT]FGQGTKVEI KRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
Hu-901 SLQPEDFATY YC[QSHEDPYT]FGQGTKVEI KRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
    
```

```

E25  SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
E26  SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
E27  SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Hu-901 SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
    
```

Фиг. 3А

Анти-IgE антитела: тяжелая цепь

	10	20	30	40	50 a	60	70	80	90
E25	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVSGYSIT	S[GYSWNN]IRQ	APGKGLEWVA	[SITYDGSSTNY NPSVKG]	RITI	SRDSDKNTFY	LQMNSLRAED
E26	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVSGYSIT	S[GYSWNN]IRQ	APGKGLEWVA	[SITYDGSSTNY NPSVKG]	RITI	SRDSDKNTFY	LQMNSLRAED
E27	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVSGYSIT	S[GYSWNN]IRQ	APGKGLEWVA	[SIKYSGETKY NPSVKG]	RITI	SRDSDKNTFY	LQMNSLRAED
Hu-901	EVQLVDSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGVTFF	S MYLEW VRQ	APGKGLEWVG	ELSPGTFITNY NEKFKQ	RITF	TALTSITNIAV	MELSSLRSED
	100	110ab	120 C _H starts						
E25	TAVYYCAR	[GS HYFGHWHFVAV]	WGQGTLLVTVSS	ASTKGPSVVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS					
E26	TAVYYCAR	[GS HYFGHWHFVAV]	WGQGTLLVTVSS	ASTKGPSVVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS					
E27	TAVYYCAR	[GS HYFGHWHFVAV]	WGQGTLLVTVSS	ASTKGPSVVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS					
Hu-901	TAVYYCAR	[S HFGSISNYDYFDY]	WGQGTLLVTVSS	ASTKGPSVVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS					
E25	VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE								
E26	VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE								
E27	VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE								
Hu-901	VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE								
E25	VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE								
E26	VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE								
E27	VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE								
Hu-901	VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE								
E25	SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK								
E26	SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK								
E27	SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK								
Hu-901	SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK								

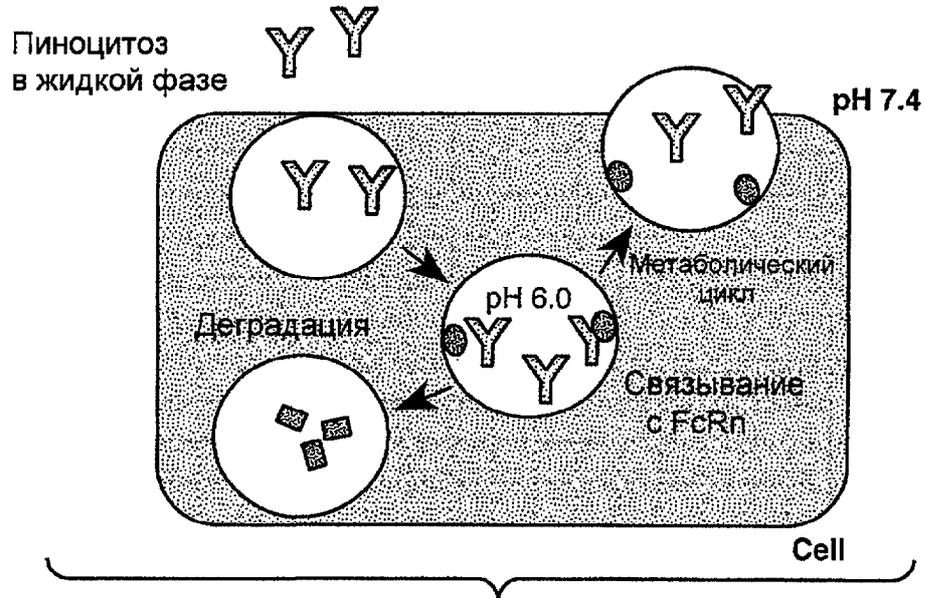
Фиг. 3B

	230	240	250	260	270
humIgG1	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV				
humIgG2	PAP-PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV				
humIgG3	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYV				
humIgG4	PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSEQEDPEVQFNWYV				
		****			* * *
	280	290	300	310	320
humIgG1	DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
humIgG2	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
humIgG3	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
humIgG4	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
			* *	*	*
	330	340	350	360	370
humIgG1	APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
				D L	
humIgG2	APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
humIgG3	APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
humIgG4	SSIIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
		**	*	*	
	380	390	400	410	420
humIgG1	EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVSMH				
humIgG2	EWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVSMH				
humIgG3	EWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVSMH				
humIgG4	EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSQVSMH				
		*	*	*	* * *
	430	440			
humIgG1	EALHNHYTQKSLSLSPGK				
humIgG2	EALHNHYTQKSLSLSPGK				
humIgG3	EALHNRFTQKSLSLSPGK				
humIgG4	EALHNHYTQKSLSLSLGK				
		**	*		

Фиг. 4

	230	240	250	260	270
humIgG1	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV				
humIgG2	PAP-PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV				
humIgG3	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYV				
humIgG4	PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYV				
murIgG1	---TVPEVSSVFIFFPPKPKDVLITITLTPKVTTCVVVDISKDDPEVQFSWFV				
murIgG2A	PAPNLLGGPSVFIFFPPKIKDVLMIISLSPIVTTCVVVDVSEDDPDVQISWFV				
murIgG2B	PAPNLEGGPSVFIFFPPNIKDVLMIISLTPKVTTCVVVDVSEDDPDVQISWFV				
murIgG3	PPGNILGGPSVFIFFPPKPKDALMIISLTPKVTTCVVVDVSEDDPDVHVSWFV				
	280	290	300	310	320
humIgG1	DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
humIgG2	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
humIgG3	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
humIgG4	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
murIgG1	DDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRVSELPIMHQDCLNGKEFKCRVNSAAFV				
murIgG2A	NNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLF				
murIgG2B	NNVEVHTAQTQTHREDYNSTIRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLF				
murIgG3	DNKEVHTAWTQPREAQYNSTFRVVSALPIQHQDWMRGKEFKCKVNNKALP				
	330	340	350	360	370
humIgG1	APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV D L				
humIgG2	APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
humIgG3	APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
humIgG4	SSEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
murIgG1	APIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITV				
murIgG2A	APIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTFDFMPEDIYV				
murIgG2B	SPIERTISKPKGLVRAPQVYTLPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISV				
murIgG3	APIERTISKPKGRAQTPQVYTIPPPREQMSKKKVSLTCLVTFNFFSEALISV				
	380	390	400	410	420
humIgG1	EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMH				
humIgG2	EWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMH				
humIgG3	EWESSGQPENNYNTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFCSCVMH				
humIgG4	EWZSNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSCVMH				
murIgG1	EWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLH				
murIgG2A	EWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVH				
murIgG2B	EWTNSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKLNMKTSKWEKTD SFSCNVRH				
murIgG3	EWERNGELEQDYKNTPPILDSDGTYFLYSKLTVDTDSWLQGEIFTC SVVH				
	430	440			
humIgG1	EALHNHYTQKSLSLSPGK				
humIgG2	EALHNHYTQKSLSLSPGK				
humIgG3	EALHNRFTQKSLSLSPGK				
humIgG4	EALHNHYTQKSLSLSLGK				
murIgG1	EGLHNHHTTEKSLSHSPGK				
murIgG2A	EGLHNHHTTKSFSRTPGK				
murIgG2B	EGLKNYYLKKTISRSPGK				
murIgG3	EALHNHHTQKNLSRSPGK				

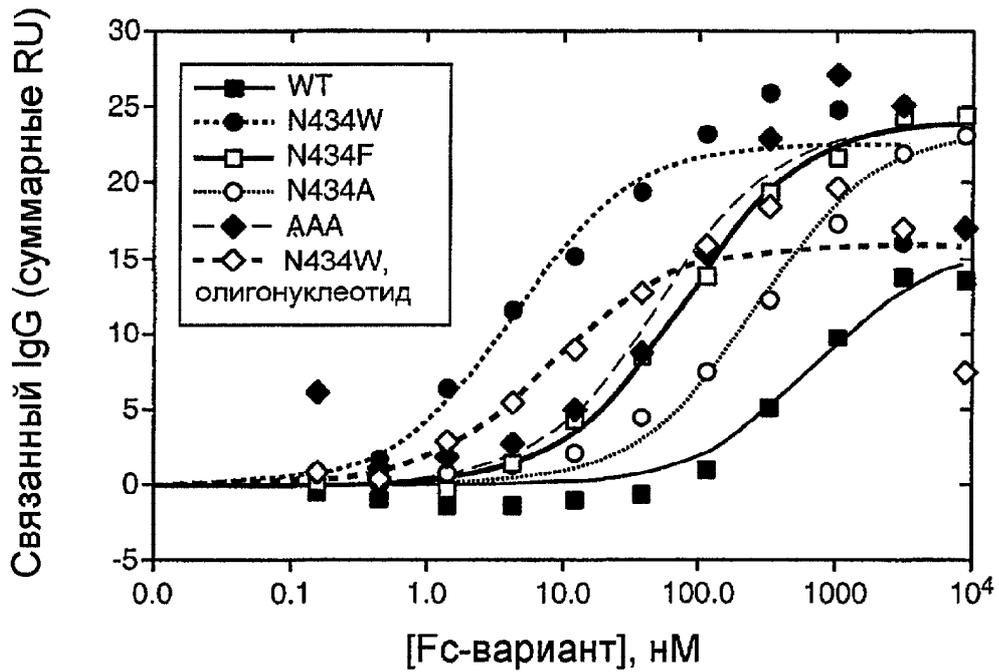
Фиг. 5



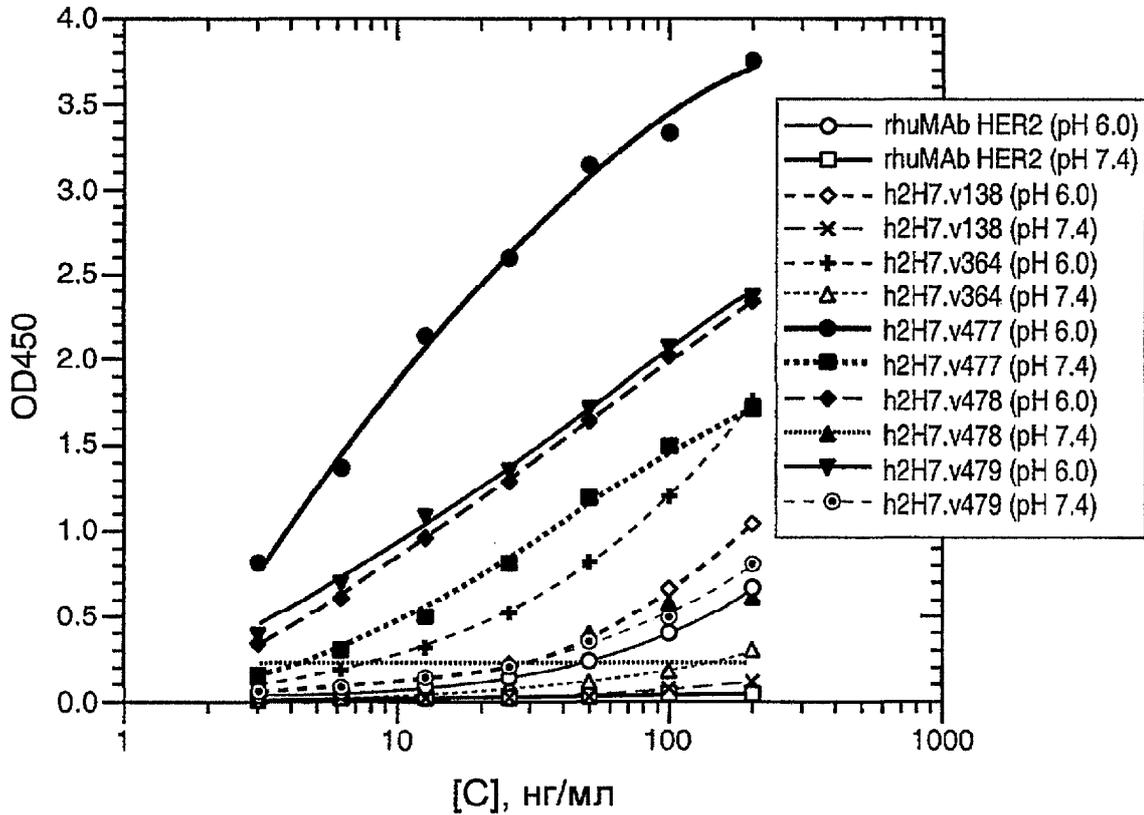
Фиг. 6

SPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKS
LSLSPGKL

Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9
Легкая цепь

C2B8

```

1 QIVLSQSPAILLSASPGKEVMTTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKRWIYA
50 TSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYQCQWTSNPPFTFGGAKLEIK
107 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
151 NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGL
201 SSPVTKSFNRGEC
    
```

C_L

Тяжелая цепь

C2B8

```

1 QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIG
50 AIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR
99 STYYGGDWYFNVWGAGTTVTVS
121 AASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
151 KDYFPEFVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT
200 QTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHT
    
```

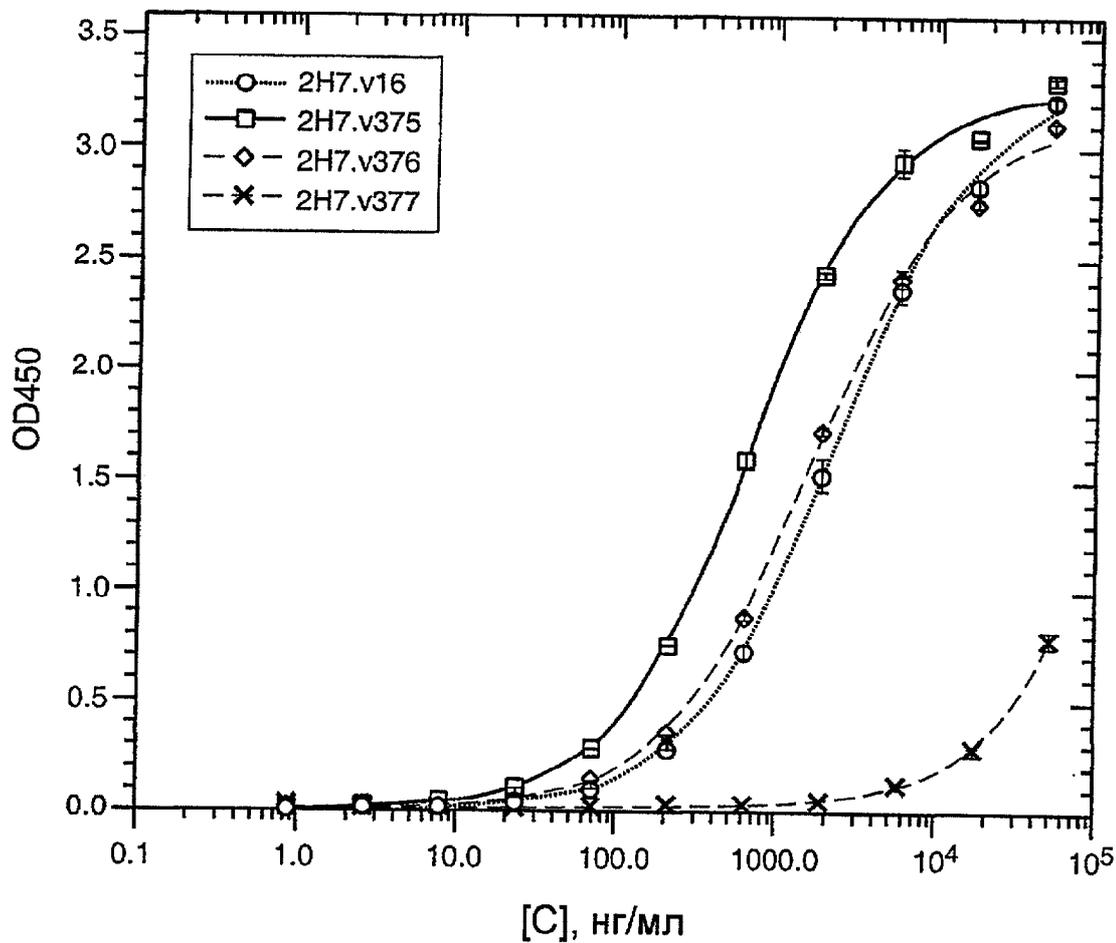
C_{H1}

```

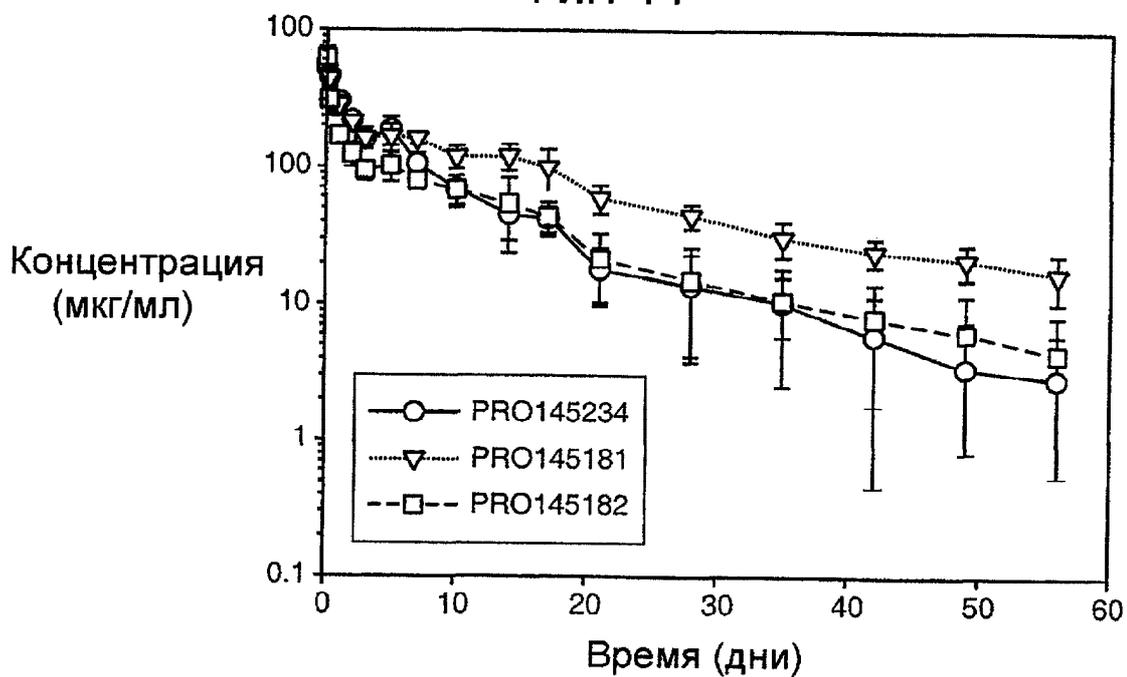
230 CPPCPAPELLGGPSVFLFPP
250 KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
300 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
350 PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
400 PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK
    
```

F_C

Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12