

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392673** (13) **A2**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.02.29

(22) Дата подачи заявки
2018.12.12

(51) Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) **ВАРИАНТЫ ДОМЕНА Fc IgG ЧЕЛОВЕКА С УЛУЧШЕННОЙ ЭФФЕКТОРНОЙ
ФУНКЦИЕЙ**

(31) **62/607,591**

(32) **2017.12.19**

(33) **US**

(62) **202091521; 2018.12.12**

(71) Заявитель:
**ДЗЕ РОКФЕЛЛЕР ЮНИВЕРСИТИ
(US)**

(72) Изобретатель:
**Равеч Джеффри В., Бурназос
Стилианос (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к вариантам домена Fc IgG человека с улучшенной эффекторной функцией и к их применениям.

202392673

A2

A2

202392673

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579701EA/042

ВАРИАНТЫ ДОМЕНА Fc IgG ЧЕЛОВЕКА С УЛУЧШЕННОЙ ЭФФЕКТОРНОЙ ФУНКЦИЕЙ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящему Патентному документу, согласно 35 U.S.C. §119(e), испрашивается приоритет Предварительной патентной заявки США No. 62/607591, поданной 19 декабря 2017 г. Полное содержание вышеуказанной патентной заявки приведено в настоящем описании в качестве ссылки для обеспечения преемственности описания.

ИНТЕРЕСЫ ПРАВИТЕЛЬСТВА

Это изобретение выполнено при поддержке правительства по гранту P01 AI100148, присужденному NIAID и NIH. Правительство обладает определенными правами на это изобретение.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к вариантам домена Fc IgG человека с улучшенной эффекторной функцией и к их применениям.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ДЛЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Обширный опыт клинического применения ряда одобренных FDA моноклональных антител (mAb) для лечения воспалительных и неопластических нарушений убедительно позволяет предполагать, что терапевтический потенциал антитела сильно зависит от взаимодействий домена Fc IgG с его родственными рецепторами, рецепторами Fc γ (Fc γ R), экспрессированными на поверхности эффекторных лейкоцитов, для опосредования ряда эффекторных функций Fc (Nimmerjahn *et al.*, *Cancer Immun* 12, 13 (2012)). Например, терапевтический исход для ряда mAb был ассоциирован с аллельными вариантами генов Fc γ R, влияющими на емкость рецептора для связывания IgG (Nimmerjahn *et al.*, *Cancer Immun* 12, 13 (2012) и Mellor *et al.*, *J Hematol Oncol* 6, 1 (2013)). Кроме того, показано, что защитная активность *in vivo* нескольких терапевтических mAb зависит от взаимодействий Fc-Fc γ R, где для вариантов домена Fc, оптимизированных для увеличения емкости связывания с Fc γ R, показан улучшенный терапевтический исход (Goede, V. *et al.* *N Engl J Med* 370, 1101-1110 (2014)). Принимая во внимание разнообразную активность передачи сигналов Fc γ R (Bournazos *et al.*, *Annu Rev Immunol* 35, 285-311 (2017)), модификация домена Fc для привлечения и активации специфических Fc γ R приводила к разработке антител IgG с улучшенной эффекторной активностью. Например, показано, что одобренное FDA mAb против CD20 обинутузумаб, сконструированное для улучшенного связывания с активирующим Fc γ R, Fc γ RIIIa, имеет превосходящую терапевтическую эффективность, по сравнению с mAb против CD20 с немодифицированным Fc (Goede, V. *et al.* *N Engl J Med* 370, 1101-1110 (2014)).

Однако, остаются различные проблемы (Klein *et al.* 2012, *MAbs*. 4(6): 653-663). В частности, показано, что разнообразие рецепторов Fc и их рестрицированная экспрессия на клетках иммунной системы вносит вклад в диапазон ответов, ассоциированных с

опосредованными антителами видами активности. Например, показано, что способность антитела индуцировать Т-клеточные ответы зависит от привлечения активирующих рецепторов Fc дендритной клетки, таких как FcRIIA (DiLillo, *et al.*, Cell 2015). Подобным образом, активация нейтрофилов посредством антител IgG требует рецепторов Fc, отличных от рецепторов клеток НК. Кроме того, как описано в настоящем описании, новые модифицированные антитела IgG по настоящему изобретению имеют периоды времени полужизни, равные или большие, чем у немодифицированного IgG1 *in vivo*. Таким образом, существует необходимость в вариантах Fc, способных к полному диапазону привлечения низкоаффинного активирующего рецептора, с минимальным привлечением ингибирующего рецептора Fc, FcRIIB.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Различные варианты осуществления, описанные в настоящем описании, направлены на удовлетворение вышеупомянутых неудовлетворенных потребностей и/или других потребностей посредством предоставления вариантов домена Fc IgG человека с улучшенными эффекторной функцией и периодами времени полужизни, и их применений.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему вариант Fc полипептида Fc IgG1 человека. Вариант Fc (i) содержит аланин (A) в положении 236, лейцин (L) в положении 330 и глутаминовую кислоту (E) в положении 332, и (ii) не содержит аспарагиновую кислоту (D) в положении 239. Нумерация представлена в соответствии с индексом EU по Kabat. Полипептид или вариант Fc может дополнительно содержать лейцин (L) в положении 428 и/или серин (S) в положении 434. В некоторых вариантах осуществления, полипептид или вариант Fc содержит серин (S) в положении 239. В некоторых примерах, полипептид или вариант Fc содержит последовательность из SEQ ID NO: 2 или 3.

Вышеупомянутый полипептид или вариант Fc может быть включен в качестве части в антитело или слитый белок (например, слит с Fv, sFv или другими вариантами антител, как описано ниже). Соответственно, в объем настоящего изобретения включены антитело или слитый белок, содержащие полипептид или вариант Fc, описанные выше. Антитело имеет специфичность для любой представляющей интерес молекулы-мишени. Например, молекула-мишень может быть выбрана из группы, состоящей из цитокина, растворимого или нерастворимого фактора, молекулы, экспрессированной на патогене, молекулы, экспрессированной на клетках, и молекулы, экспрессированной на клетках злокачественных опухолей. Факторы и молекулы могут представлять собой белки и не белки, такие как углеводы и липиды. Антитело может быть выбрано из группы, состоящей из химерного антитела, гуманизированного антитела или человеческого антитела. Вышеописанное антитело может иметь один или несколько из следующих признаков: (1) более высокая аффинность связывания с hFcγRIIA, hFcγRIIA, FcRn или/и hFcγRIIB, по сравнению с эталонным антителом, имеющим последовательность из SEQ ID NO: 1, (2) более длительное время полужизни в сыворотке по сравнению с эталонным антителом,

имеющим последовательность из SEQ ID NO: 1 или 4, и (3) идентичное или лучшее время полужизни, по сравнению с антителом, имеющим последовательность из SEQ ID NO:1. Вышеописанное антитело, как правило, является таким же, как эталонное антитело, за исключением того, что последнее имеет отличную последовательность Fc, например, SEQ ID NO: 1 или 4. Например, вариант GAALIE (SEQ ID NO: 2), описанный в настоящем описании, неожиданно является более стабильным с более длительным временем полужизни, чем вариант GASDALIE (SEQ ID NO: 4).

В объем настоящего изобретения включены также выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую полипептид или антитело, описанные выше, экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, и клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту. Клетку-хозяина можно использовать в способе получения рекомбинантного полипептида или антитела. Способ включает культивирование клетки-хозяина в среде в условиях, позволяющих экспрессию полипептида или антитела, кодированного нуклеиновой кислотой, и очистку полипептида или антитела из культивированной клетки или среды от клетки.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтическому составу, содержащему (i) полипептид, антитело или нуклеиновую кислоту, описанные выше, и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения нарушения, такого как воспалительное нарушение, неопластическое нарушение или инфекционное заболевание. Способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества вышеописанных полипептида, антитела или нуклеиновой кислоты. Также в объем настоящего изобретения включены применения полипептида, антитела или нуклеиновой кислоты в изготовлении лекарственного средства для лечения нарушения, такого как воспалительное нарушение, неопластическое нарушение или инфекционное заболевание.

Детали одного или нескольких вариантов осуществления изобретения указаны в описании ниже. Другие признаки, цели и преимущества изобретения станут очевидными из описания и из формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

ФИГ. 1А, 1В, 1С и 1D (совместно «ФИГ. 1») представляют собой диаграммы, показывающие время полужизни *in vivo* мутанта домена Fc G236A/S239D/A330L/I332E («GASDALIE») у мышей с гуманизированным Fc γ R (FcR+)(ФИГ. 1А и ФИГ. 1С) и у мышей с недостаточностью FcR (FcR нуль) (ФИГ. 1В и ФИГ. 1D). Вариант S239D/I332E («SDIE») включен в качестве контроля. На ФИГ. 1С и ФИГ. 1D показаны уровни IgG в сыворотке для вариантов Fc IgG1 человека через 8 суток после введения мышам с гуманизированным Fc γ R (ФИГ. 1С) и мышам с недостаточностью FcR (ФИГ. 1D).

ФИГ. 2А и 2В (совместно «ФИГ. 2») представляют собой диаграммы, показывающие определение время полужизни *in vivo* мутантов домена Fc у макаков-резусов. IgG1 человека дикого типа (WT) (ФИГ. 2А) и варианты домена Fc mAb 3BNC117

G236A/A330L/I332E/M428L/N434S («GASDALIE LS») (ФИГ. 2В) вводили (i.v.; 20 мг/кг) макакам-резусам. Уровни IgG для IgG1 человека оценивали посредством ELISA в различных временных точках после введения макакам-резусам для определения времени полужизни антитела (выраженного как час).

ФИГ. 3А и 3В (совместно «ФИГ. 3») представляют собой таблицы, показывающие аффинность связывания вариантов домена Fc IgG1 человека для FcγR человека (FcγRIa H131, FcγRIa R131, FcγRIIb, FcγRIIIa V157, FcγRIIIa F157), определенную посредством анализа SPR. На ФИГ. 3А показаны измерения аффинности (KD (M)), и на ФИГ. 3В показана кратность увеличения аффинности, по сравнению с IgG1 человека дикого типа. Тестируемые варианты: SDIE (S239D/I332E); GAIE (G236A/I332E); GAALIE (G236A/A330L/I332E); афукозилированный (лишенный разветвленного остатка фукозы на связанном с Fc гликане).

ФИГ. 4 представляет собой набор диаграмм, показывающих сенсограммы SPR связывания IgG1 человека дикого типа (слева) и варианта GAALIE домена Fc (справа) для FcγR человека (FcγRIa H131, FcγRIa R131, FcγRIIb, FcγRIIIa V157, FcγRIIIa F157). Обозначения представляют собой концентрацию (мкМ) аналита (FcγR).

ФИГ. 5А и 5В (совместно «ФИГ. 5») представляют собой таблицы, показывающие аффинность связывания вариантов домена Fc IgG1 человека для FcγR мыши, определенную посредством анализа SPR. На ФИГ. 5А показаны измерения аффинности (KD (M)), и на ФИГ. 5В показана кратность увеличения аффинности, по сравнению с IgG1 человека дикого типа. Тестируемые варианты: SDIE (S239D/I332E); GAIE (G236A/I332E); GAALIE (G236A/A330L/I332E); афукозилированный (лишенный разветвленного остатка фукозы на связанном с Fc гликане).

ФИГ. 6 представляет собой набор диаграмм, показывающих сенсограммы SPR связывания IgG1 человека дикого типа (слева) и варианта GAALIE домена Fc (справа) для FcγR мыши. Обозначения представляют собой концентрацию (мкМ) аналита (FcγR).

ФИГ. 7А и 7В (совместно «ФИГ. 7») представляют собой таблицы, показывающие аффинность связывания вариантов домена Fc IgG1 человека для FcγR макака-резуса, определенную посредством анализа SPR. На ФИГ. 7А показаны измерения аффинности (KD (M)), и на ФИГ. 7В показана кратность увеличения аффинности, по сравнению с IgG1 человека дикого типа. Тестируемые варианты: SDIE (S239D/I332E); GAIE (G236A/I332E); GAALIE (G236A/A330L/I332E); афукозилированный (лишенный разветвленного остатка фукозы на связанном с Fc гликане).

ФИГ. 8 представляет собой набор диаграмм, показывающих сенсограммы SPR связывания IgG1 человека дикого типа (слева) и варианта GAALIE домена Fc (справа) для FcγR макака-резуса. Обозначения представляют собой концентрацию (мкМ) аналита (FcγR).

ФИГ. 9 представляет собой диаграмму, показывающую истощение тромбоцитов с использованием вариантов Fc mAb 6A6 у мышей с гуманизированным FcγR. Мышам вводили варианты домена Fc mAb 6A6 (SDIE (S239D/I332E); GAIE (G236A/I332E);

GAALIE (G236A/A330L/I332E)). N297A (не связывающий FcR вариант) включен в качестве контроля. Количество тромбоцитов анализировали в указанных временных точках, и значения представляют собой средний (\pm SEM) процент изменения количества тромбоцитов, по сравнению с предварительным отбором крови в 0 час.

ФИГ. 10 представляет собой диаграмму, показывающую истощение CD4⁺ клеток с использованием вариантов Fc mAb GK1.5 у мышей с гуманизированным Fc γ R. Мышам вводили варианты домена Fc (100 мкг, i.p.) mAb GK1.5 (SDIE (S239D/I332E); GAIE (G236A/I332E); GAALIE (G236A/A330L/I332E)). GRLR (G236R/L328R; не связывающий FcR вариант) включен в качестве контроля. Количество CD4⁺ клеток анализировали через 24 час после введения mAb в крови (A) и селезенке (B).

ФИГ. 11A, 11B, 11C и 11D (совместно «ФИГ. 11») представляют собой диаграммы, показывающие истощение CD20⁺ В-клеток с использованием вариантов Fc mAb CAT у мышей с гуманизированным hCD20⁺/Fc γ R. Мышам вводили варианты домена Fc (200 мкг, i.p.) mAb CAT (SDIE (S239D/I332E); GAIE (G236A/I332E); GAALIE (G236A/A330L/I332E)). N297A (не связывающий FcR вариант) включен в качестве контроля. Количество и частоты CD20⁺ клеток анализировали через 48 час после введения mAb в крови (ФИГ. 11A и ФИГ. 11B) и селезенке (ФИГ. 11C и ФИГ. 11D).

ФИГ. 12A и 12B (совместно «ФИГ. 12») представляют собой диаграммы, показывающие истощение CD20⁺ В-клеток с использованием вариантов Fc mAb 2B8 у мышей с hCD20⁺/гуманизированным Fc γ R. Мышам вводили i.p. IgG1 человека дикого типа или варианты mAb 2B8 против CD20 GAALIE (G236A/A330L/I332E) в указанной дозе. Частоты (ФИГ. 12A) и количество (ФИГ. 12B) CD20⁺ клеток анализировали через 48 час после введения mAb в крови.

ФИГ. 13A, 13B, и 13C (совместно «ФИГ. 13») представляют собой диаграммы, показывающие время полужизни *in vivo* мутантов домена Fc у мышей с недостаточностью FcR (FcR нуль) (ФИГ. 13A) и у мышей с гуманизированным Fc γ R (FcR+) (ФИГ. 13B). Мутанты домена Fc IgG1 человека включали: SDIE (S239D/I332E), GAIE (G236A/I332E) и GAALIE (G236A/A330L/I332E). На ФИГ. 13C показаны уровни IgG для IgG1 человека в различных временных точках после введения мышам с гуманизированным Fc γ R.

ФИГ. 14A и 14B (совместно «ФИГ. 14») представляют собой диаграммы, показывающие определение времени полужизни *in vivo* мутантов домена Fc у макаков-резусов. IgG1 человека дикого типа (WT) (ФИГ. 14A) и варианты домена Fc mAb 3BNC117 GAALIE (G236A/A330L/I332E) (ФИГ. 14B) вводили (i.v.; 20 мг/кг) макакам-резусам. Уровни IgG для IgG1 человека оценивали посредством ELISA в различных временных точках после введения макакам-резусам для определения времени полужизни антитела (выраженного как час).

ФИГ. 15A и 15B (совместно «ФИГ. 15») представляют собой диаграммы, показывающие истощение CD20⁺ В-клеток с использованием вариантов Fc mAb 2B8 у макаков-резусов. IgG1 человека дикого типа или варианты GAALIE (G236A/A330L/I332E) mAb 2B8 против CD20 вводили макакам-резусам (i.v.) при 0,05 мг/кг. Частоты (ФИГ. 15A)

и количество (ФИГ. 15В) CD20+ клеток анализировали в крови в различных временных точках до и после введения антитела.

На ФИГ. 16 показаны белковые последовательности константных областей IgG1 человека (дикий тип и варианты домена Fc). Аминокислотные замены для каждого варианта подчеркнуты. Нумерация остатков следует системе нумерации EU.

ФИГ. 17 представляет собой диаграмму, показывающую T_m белка для различных мутантов домена Fc, определенную посредством анализа температурного сдвига. Мутанты домена Fc IgG1 человека включали: SDIE (S239D/I332E), GAIE (G236A/I332E), GAALIE (G236A/A330L/I332E) и GASDALIE (G236A/S239D/A330L/I332E). Эти мутанты комбинировали с мутацией LS (M428L/N434S), которая увеличивает аффинность IgG1 человека для FcRn.

ФИГ. 18 представляет собой таблицу, показывающую аффинность связывания вариантов домена Fc IgG1 человека для FcRn/ β 2 микроглобулина человека при pH 6,0, как определено посредством анализа SPR. Представлены измерения аффинности (KD (M)) и кратность увеличения аффинности, по сравнению с IgG1 человека дикого типа. Мутанты домена Fc IgG1 человека включали: SDIE (S239D/I332E), GAIE (G236A/I332E) и GAALIE (G236A/A330L/I332E). Эти мутанты комбинировали с мутацией LS (M428L/N434S).

ФИГ. 19 представляет собой набор диаграмм, показывающих сенсограммы SPR связывания вариантов домена Fc с FcRn/ β 2 микроглобулином человека при pH 6,0. Обозначения представляют собой концентрацию (нМ) аналита (FcRn). Мутанты домена Fc IgG1 человека включали: LS (M428L/N434S), GAALIE (G236A/A330L/I332E) и GAALIE LS (G236A/A330L/I332E/M428L/N434S).

ФИГ. 20 представляет собой набор диаграмм, показывающих сенсограммы SPR связывания вариантов домена Fc с FcRn/ β 2 микроглобулином человека при pH 7,4. Обозначения представляют собой концентрацию (нМ) аналита (FcRn). Мутанты домена Fc IgG1 человека включали: LS (M428L/N434S), GAALIE (G236A/A330L/I332E) и GAALIE LS (G236A/A330L/I332E/M428L/N434S).

ФИГ. 21А, 21В и 21С (совместно «ФИГ. 21») представляют собой набор диаграмм, показывающих время полужизни *in vivo* мутантов домена Fc у мышей с гуманизированным FcRn/Fc γ R. Мутанты домена Fc IgG1 человека включали: LS (M428L/N434S), GAALIE (G236A/A330L/I332E), и GAALIE LS (G236A/A330L/I332E/M428L/N434S). На ФИГ. 21А и ФИГ. 21В показаны уровни IgG для IgG1 человека в различных временных точках после введения мышам с гуманизированным FcRn/Fc γ R. На ФИГ. 21С показано расчетное время полужизни вариантов домена Fc у мышей с гуманизированным FcRn/Fc γ R.

ФИГ. 22 представляет собой диаграмму, показывающую истощение тромбоцитов с использованием вариантов Fc mAb 6A6 у мышей с гуманизированным FcRn/Fc γ R. Мышам вводили варианты домена Fc mAb 6A6 (8 мкг; i.v.)(LS (M428L/N434S), GAALIE (G236A/A330L/I332E) и GAALIE LS (G236A/A330L/I332E/M428L/N434S)). N297A (не связывающий FcR вариант) включен в качестве контроля. Количество тромбоцитов

анализировали в указанных временных точках, и значения представляют собой средний (\pm SEM) процент изменения количества тромбоцитов, по сравнению с предварительным отбором крови в 0 час.

ФИГ. 23А, 23В, 23С, и 23D (совместно «ФИГ. 23») представляют собой диаграммы, показывающие, что нацеленные на sLeA Ab с использованием Fc hIgG1 стимулируют клиренс опухоли, усиленный посредством привлечения активирующих Fc γ R человека. Мышам с гуманизированным Fc γ R инокулировали IV 5*10⁵ клеток опухоли B16-FUT3. 100 мкг Ab против sLeA или контрольные Ab совпадающего изотипа вводили IP на сутки 1,4,7 и 11. Через 14 суток после инокуляции, мышей подвергали эвтаназии, легкие вырезали и фиксировали, и очаги метастазирования подсчитывали. $n \geq 5$ /группу. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. **** $p < 0,0001$. На ФИГ. 23А и 23В показано, что Ab hIgG1 против sLeA ингибируют колонизацию легких sLeA⁺ клетками опухолей. Мышей обрабатывали с использованием 100 мкг Ab против sLeA (5B1-hIgG1 или 7E3-hIgG1) или контрольных Ab совпадающего изотипа. На ФИГ. 23А показан обзорный анализ данных, полученных для всех мышей из репрезентативного эксперимента, и на ФИГ. 23В показаны репрезентативные изображения трех вырезанных легких из каждой группы. На ФИГ. 23В показано также, что варианты Ab против sLeA с модифицированным Fc имеют превосходную противоопухолевую эффективность - мышей обрабатывали с использованием 100 мкг Ab против sLeA (клоны 5B1 или 7E3, hIgG1 или hIgG1-GAALIE с мутациями G236A/A330L/I332E) или контрольных Ab совпадающего изотипа. На ФИГ. 23С показан обзорный анализ данных, полученных для всех мышей в двух отдельных экспериментах (первый эксперимент - ■, второй эксперимент - ▲), в то время как на ФИГ. 23D показаны репрезентативные изображения вырезанных легких от мышей, обработанных с использованием Ab 5B1.

ФИГ. 24А, 24В, и 24С (совместно «ФИГ. 24») представляют собой диаграммы, показывающие, что привлечение либо hFcRIIA, либо hFcRIIIA, является необходимым и достаточным для опосредованного Ab клиренса опухоли. На ФИГ. 24А показана относительная аффинность связывания вариантов Fc hIgG1 с FcR человека - аффинность, как определено посредством исследований SPR. На ФИГ. 24В показаны Ab 5B1-hIgG1 с увеличенной аффинностью связывания с hFcRIIA или hFcRIIIA, или с обоими, имеющие превосходный противоопухолевый эффект. Мышам с гуманизированным Fc γ R инокулировали IV 5*10⁵ клеток опухоли B16-FUT3. 100 мкг Ab против sLeA (5B1-hIgG1, 5B1-hIgG1-GA с мутацией G236A, 5B1-hIgG1-ALIE с мутациями A330L/I332E или 5B1-hIgG1-GAALIE с мутациями G236A/A330L/I332E) или контрольных Ab совпадающего изотипа вводили IP на сутки 1, 4, 7 и 11. На ФИГ. 24С показано привлечение hFcRIIA или hFcRIIIA, которое является необходимым для эффективного клиренса опухоли для sLeA⁺ опухолей. FcR-нуль (КО цепи γ), мышам с гуманизированным Fc γ R, трансгенным мышам hFcRIIA/IIВ и трансгенным мышам hFcRIIIA/IIIВ инокулировали IV 5*10⁵ клеток опухоли B16-FUT3. 100 мкг Ab против sLeA (5B1-hIgG1-GAALIE с мутациями G236A/A330L/I332E) или контрольных Ab совпадающего изотипа вводили IP на сутки 1,

4, 7 и 11. Для панелей В+С, через 14 суток после инокуляции, мышей подвергали эвтаназии, легкие вырезали и фиксировали, и очаги метастазирования подсчитывали. $n \geq 6$ /группу. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. **** $p < 0,0001$.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к вариантам домена Fc IgG человека с улучшенной эффекторной функцией и к их применениям. Как описано в настоящем описании, антитела или слитые белки, имеющие варианты домена Fc IgG, имеют увеличенное связывание с активирующими рецепторами Fc и периоды времени полужизни, равные или большие, чем немодифицированные антитела IgG1 *in vivo*.

Области Fc или константные области антител взаимодействуют с клеточными партнерами по связыванию для опосредования функции и активности антитела, таких как антителозависимые эффекторные функции и активация комплемента. Для антител типа IgG, участки связывания для компонента комплемента C1q и рецепторов Fc (FcγR) локализованы в домене CH2 области Fc. Совместная экспрессия активирующих и ингибирующих FcR на различных клетках-мишенях модулирует опосредованные антителами иммунные ответы. В дополнение к их вовлечению в эфферентную фазу иммунного ответа, FcR также являются важными для регуляции активации В-клетки и дендритной клетки (DC). Например, в случае антител типа IgG, различные классы FcγR опосредуют различные клеточные ответы, такие как фагоцитоз посредством макрофагов, антителозависимая опосредуемая клетками цитотоксичность посредством клеток NK и дегрануляция тучных клеток. Для каждого FcγR показаны различные аффинности связывания и специфичность для подкласса IgG. Лектиновые рецепторы также играют роль. Например, показано, что DC-SIGN играет роль в противовоспалительной активности Fc, например, в IVIG (см., например, US20170349662, WO2008057634 и WO2009132130).

Как описано в настоящем описании, биологическую активность антитела/иммуноглобулина можно подвергать манипуляции, изменению или контролю посредством введения мутаций или изменения определенных аминокислот области Fc. Виды биологической активности, которые можно подвергать манипуляции, изменению или контролю в рамках изобретения, включают, например, один или несколько из: связывания рецептора Fc, аффинности рецептора Fc, специфичности рецептора Fc, активации комплемента, активности передачи сигналов, активности нацеливания, эффекторной функции (такой как программируемая гибель клетки или клеточный фагоцитоз), времени полужизни, клиренса и трансцитоза.

I. Определения

Термины «пептид», «полипептид» и «белок» используют в настоящем описании взаимозаменяемо для описания расположения аминокислотных остатков в полимере. Пептид, полипептид или белок может состоять из стандартных 20 природных аминокислот, в дополнение к редким аминокислотам и синтетическим аналогам аминокислот. Они могут представлять собой любую цепь из аминокислот, независимо от длины или посттрансляционной модификации (например, гликозилирования или

фосфорилирования).

«Рекомбинантный» пептид, полипептид или белок относится к пептиду, полипептиду или белку, полученному способами рекомбинантной ДНК; т.е., полученному из клеток, трансформированных экзогенной конструкцией ДНК, кодирующей желательный пептид. «Синтетический» пептид, полипептид или белок относится к пептиду, полипептиду или белку, полученному посредством химического синтеза. Термин «рекомбинантный» при использовании применительно, например, к клетке или нуклеиновой кислоте, белку или вектору, показывает, что клетку, нуклеиновую кислоту, белок или вектор модифицировали посредством введения гетерологичной нуклеиновой кислоты или белка, или изменения природных нуклеиновой кислоты или белка, или что клетка происходит от клетки, модифицированной таким образом. В объем настоящего изобретения включены слитые белки, содержащие одну или несколько из вышеупомянутых последовательностей и гетерологичную последовательность. Гетерологичные полипептид, нуклеиновая кислота или ген являются происходящими из чужеродного вида, или, если происходят из того же вида, являются по существу модифицированными из исходной формы. Два слитых домена или последовательности являются гетерологичными друг для друга, если они не являются смежными друг с другом в природных белке или нуклеиновой кислоте.

«Выделенный» пептид, полипептид, или белок относится к пептиду, полипептиду или белку, отделенному от других белков, липидов и нуклеиновых кислот, с которыми он ассоциирован в природе. Полипептид/белок может составлять по меньшей мере 10% (т.е., любой процент между 10% и 100%, например, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% и 99%) от массы в сухом состоянии очищенного препарата. Чистоту можно измерять любым подходящим стандартным способом, например, колоночной хроматографией, электрофорезом в полиакриламидном геле или анализом HPLC. Выделенный полипептид/белок, описанный по изобретению, можно получать способами рекомбинантной ДНК, очищать из источника из трансгенного животного или получать химическими способами. Функциональный эквивалент Fc IgG относится к полипептидному производному Fc IgG, например, к белку, имеющему одну или несколько точечных мутаций, вставок, делеций, укорочений, к слитому белку или их комбинации. Он по существу сохраняет активность Fc IgG, т.е., способность связываться с соответствующим рецептором и запускать соответствующий клеточный ответ. Выделенный полипептид может содержать SEQ ID NO: 2 или 3. Как правило, функциональный эквивалент является по меньшей мере на 75% (например, на любое количество между 75% и 100%, включительно, например, на 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% и 99%) идентичным SEQ ID NO: 2 или 3.

«Антиген» относится к веществу, которое вызывает иммунологическую реакцию или связывается с продуктами такой реакции. Термин «эпитоп» относится к области антигена, с которой связывается антитело или Т-клетка.

В рамках изобретения, «антитело» используют в самом широком смысле, и оно

конкретно включает моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они имеют желательную биологическую активность. Термин «антитело» (Ab), в рамках изобретения, включает моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела и полиреактивные антитела) и фрагменты антител. Таким образом, термин «антитело», как используют в любом контексте в настоящем описании, понимают как включающий, но без ограничения, любой специфически связывающий член, класс и/или изотип иммуноглобулинов (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD, IgE и IgM); и их биологически значимый фрагмент или специфически связывающий член, включая, но без ограничения, Fab, F(ab')₂, Fv и scFv (одноцепочечную или родственную молекулу). В данной области известно, что антитело представляет собой гликопротеин, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, или его антигенсвязывающую часть. Тяжелая цепь состоит из варибельной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (CH1, CH2 и CH3). Легкая цепь состоит из варибельной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Варибельные области как тяжелых, так и легких цепей, содержат каркасные области (FWR) и определяющие комплементарность области (CDR). Четыре области FWR являются относительно консервативными, в то время как области CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) представляют собой гиперварибельные области и расположены от NH₂-конца до COOH-конца следующим образом: FWR1, CDR1, FWR2, CDR2, FWR3, CDR3 и FWR4. Варибельные области тяжелых и легких цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном, в то время как, в зависимости от изотипа, константная область(области) могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина. В определение «антитело», в рамках изобретения, включены также химерные антитела, гуманизированные антитела и рекомбинантные антитела, человеческие антитела, полученные от трансгенного не относящегося к человеку животного, так же как антитела, отобранные из библиотек с использованием способов обогащения, доступных для специалиста в данной области.

В рамках изобретения, «фрагменты антител» могут содержать часть интактного антитела, как правило, включая антигенсвязывающую и варибельную область интактного антитела и/или область Fc антитела, которая сохраняет способность связывания FcR. Примеры фрагментов антител включают линейные антитела; одноцепочечные молекулы антитела; и мультиспецифические антитела, сформированные из фрагментов антител. Предпочтительно, фрагменты антител сохраняют полную константную область тяжелой цепи IgG и включают легкую цепь IgG.

Термин «моноклональное антитело», в рамках изобретения, относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е., индивидуальные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных

природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высоко специфическими, направленными против одного антигенного участка. Кроме того, в отличие от общепринятых препаратов (поликлональных) антител, которые, как правило, включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. Определение «моноклональные» указывает на характер антитела, как полученного из по существу гомогенной популяции антител, и его не следует истолковывать как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела для использования в соответствии с настоящим изобретением можно получать способом гибридомы, впервые описанным в Kohler and Milstein, *Nature*, 256, 495-497 (1975), содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки, или их можно получать способами рекомбинантной ДНК (см., например, Патент США No. 4816567, содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки). Моноклональные антитела можно также выделять из фаговых библиотек антител с использованием способов, описанных, например, в Clackson et al., *Nature*, 352, 624-628 (1991) и Marks et al., *J Mol Biol*, 222, 581-597 (1991), содержание каждого из которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

Моноклональные антитела в настоящем описании конкретно включают «химерные» антитела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителах, происходящих из конкретного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, в то время как остаток цепи(цепей) является идентичным или гомологичным соответствующим последовательностям в антителах, происходящих из другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, так же как фрагменты таких антител, при условии, что они имеют желательную биологическую активность (см. Патент США No. 4816567; Morrison et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 81, 6851-6855 (1984); Neuberger et al., *Nature*, 312, 604-608 (1984); Takeda et al., *Nature*, 314, 452-454 (1985); Международная патентная заявка No. PCT/GB85/00392, содержание каждого из которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки).

«Гуманизированные» формы не относящихся к человеку (например, мышинных) антител представляют собой химерные антитела, содержащие минимальную последовательность, происходящую из не относящегося к человеку иммуноглобулина. По большей части, гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (реципиентное антитело), в которых остатки из гипервариабельной области реципиента заменены на остатки из гипервариабельной области (донорного антитела) из не относящегося к человеку вида, такого как мышь, крыса, кролик или не относящийся к человеку примат, имеющего желательную специфичность, аффинность и емкость. В некоторых случаях, остатки каркасной области (FR) Fv человеческого иммуноглобулина заменены на соответствующие не относящиеся к человеку остатки.

Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, не обнаруженные в реципиентном антителе или в донорном антителе. Эти модификации осуществляют для дополнительного уточнения активности антитела. Как правило, гуманизированное антитело может содержать в основном все из по меньшей мере одного, и как правило, двух, переменных доменов, в которых все или в основном все из гиперпеременных петель соответствуют петлям не относящегося к человеку иммуноглобулина, и все или в основном все из остатков FR представляют собой остатки из последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело, необязательно, может также содержать по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Дополнительные подробности см. в Jones et al., *Nature*, 321, 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332, 323-329 (1988); Presta, *Curr Opin Struct Biol*, 2, 593-596 (1992); Патенте США No. 5225539, содержание каждого из которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

«Человеческие антитела» относятся к любому антителу с полностью человеческими последовательностями, такому, какое можно получать из человеческой гибридомы, человеческой библиотеки фагового дисплея или трансгенной мыши, экспрессирующей последовательности человеческого антитела.

Термин «переменный» относится к тому факту, что конкретные фрагменты переменных (V) доменов существенно различаются по последовательности между антителами. Домен V опосредует связывание антигена и определяет специфичность конкретного антитела для его конкретного антигена. Однако, переменность не является равномерно распределенной на протяжении 110-аминокислотных переменных областей. Вместо этого, области V состоят из относительно инвариантных отрезков, называемых каркасными областями (FR) из 15-30 аминокислот, разделенных более короткими областями чрезвычайной переменной, называемых «гиперпеременными областями», каждая из которых имеет длину 9-12 аминокислот. Каждая из переменных областей природных тяжелых и легких цепей содержит четыре FR, по большей части принимающие конфигурацию бета-листа, соединенные тремя гиперпеременными областями, формирующими петли, соединяющие структуры бета-листа, и в некоторых случаях, формирующие их часть. Гиперпеременные области на каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости посредством FR и, вместе с гиперпеременными областями из другой цепи, участвуют в формировании антигенсвязывающего участка антител (см., например, Kabat et al., *Sequences of Protein of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

Термин «гиперпеременная область», в рамках изобретения, относится к аминокислотным остаткам антитела, ответственным за связывание антигена. Гиперпеременная область, как правило, содержит аминокислотные остатки из «определяющей комплементарности области» («CDR»).

«Fv» представляет собой минимальный фрагмент антитела, содержащий полный

участок, узнающий и связывающий антиген. Этот фрагмент содержит димер домена переменной области одной тяжелой и одной легкой цепи в жесткой, нековалентной связи. Из сворачивания этих двух доменов происходят шесть гиперпеременных петель (по три петли из каждой из цепей H и L), которые вносят вклад в аминокислотные остатки для связывания антигена и придают антителу специфичность связывания антигена. Однако, даже одна переменная область (или половина Fv содержащая только три CDR, специфические для антигена) имеет способность узнавать и связывать антиген, хотя и с меньшей аффинностью, чем целый связывающий участок.

«Одноцепочечные Fv» («sFv» или «scFv») представляют собой фрагменты антител, содержащие домены антитела VH и VL, соединенные в одной полипептидной цепи. Полипептид sFv может дополнительно содержать полипептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет scFv формировать желательную структуру для связывания антигена. Обзор sFv, см., например, в Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Vorrebaeck 1995, ниже.

Термин «диатела» обозначает малые фрагменты антител, полученные посредством конструирования фрагментов sFv с короткими линкерами (приблизительно 5-10 остатков) между доменами VH и VL, таким образом, чтобы обеспечивать спаривание между доменами доменами V между цепями, но не внутри цепи, получая в результате двухвалентный фрагмент, т.е., фрагмент, имеющий два антигенсвязывающих участка. Биспецифические диатела представляют собой гетеродимеры двух «перекрестных» фрагментов sFv, в которых домены VH и VL двух антител присутствуют на различных полипептидных цепях. Диатела более полно описаны, например, в EP 404097; WO 93/11161; и Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

Доменные антитела (dAb), которые можно получать в полностью человеческой форме, представляют собой наименьшие известные антигенсвязывающие фрагменты антител, лежащие в диапазоне от приблизительно 11 кДа до приблизительно 15 кДа. Dab представляют собой устойчивые переменные области тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов (VH и VL, соответственно). Они экспрессируются на высоком уровне в культуре клеток микроорганизмов, имеют благоприятные биофизические свойства, включая, например, но без ограничения, растворимость и термостабильность, и хорошо подходят для отбора и аффинного созревания посредством систем отбора *in vitro*, например, таких как фаговый дисплей. Dab являются биологически активными в форме мономеров и, благодаря их малому размеру и присущей им стабильности, их можно переводить в формат более крупных молекул для получения лекарственных средств с продленными периодами времени полужизни в сыворотке или другими видами фармакологической активности. Примеры этой технологии описаны, например, в WO9425591 для антител, происходящих из тяжелой цепи Ig верблюжьих, так же как в US20030130496, описывающем выделение однодоменных полностью человеческих антител из фаговых библиотек.

Fv и sFv являются единственными видами с интактными участками связывания, лишенными константных областей. Таким образом, они являются подходящими для уменьшения неспецифического связывания во время использования *in vivo*. Можно конструировать слитые с sFv белки для получения слияния эффекторного белка либо с амино-, либо с карбокси-концом sFv. См., например, *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, выше. Фрагмент антитела может также представлять собой «линейное антитело», например, как описано в Патенте США No. 5641870. Такие линейные фрагменты антител могут являться моноспецифическими или биспецифическими.

В рамках изобретения, термин «фрагмент Fc» или «область Fc» используют для определения С-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина. Такая область Fc представляет собой хвостовую область антитела, которая взаимодействует с рецепторами Fc и некоторыми белками системы комплемента. Область Fc может представлять собой природную последовательность области Fc или вариант области Fc. Хотя границы области Fc тяжелой цепи иммуноглобулина могут меняться, область Fc тяжелой цепи IgG человека обычно определяют как простирающуюся от аминокислотного остатка в положении Cys226 или от Pro230, до его карбокси-конца. Природная последовательность области Fc содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности области Fc, обнаруженной в природе. Вариант области Fc, как понятно специалисту в данной области, содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от природной последовательности области Fc из-за по меньшей мере одной «модификации аминокислоты».

В антителах изотипов IgG, IgA и IgD, область Fc состоит из двух идентичных фрагментов белка, происходящих из второго и третьего константных доменов двух тяжелых цепей антитела; области Fc IgM и IgE содержат три константных домена (домены CH 2-4) тяжелой цепи в каждой полипептидной цепи. Области Fc IgG несут высоко консервативный участок N-гликозилирования. Гликозилирование фрагмента Fc является важным для опосредованной рецептором Fc активности. N-гликаны, присоединенные к этому участку, преимущественно представляют собой двухантенные структуры комплексного типа с коровым фукозилированием. Кроме того, небольшие количества этих N-гликанов также несут разделенный надвое GlcNAc и остатки α -2,6-связанной сиаловой кислоты. См., например, US20170349662, US20080286819, US20100278808, US20100189714, US 2009004179, 20080206246, 20110150867 и WO2013095966, содержание каждого из которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

«Природная последовательность области Fc» содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности области Fc, обнаруженной в природе. «Вариант области Fc» или «вариант Fc» или «вариант домена Fc», как понятно специалисту в данной области, содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от природной последовательности области Fc из-за по меньшей мере одной «модификации аминокислоты». Предпочтительно, вариант области Fc имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену, по сравнению с

природной последовательностью области Fc или с областью Fc исходного полипептида, например, от приблизительно одной до приблизительно десяти аминокислотных замен, и предпочтительно, от приблизительно одной до приблизительно шести, пяти, четырех, трех или двух аминокислотных замен в природной последовательности области Fc или в области Fc исходного полипептида. Вариант области Fc в настоящем описании может, предпочтительно, иметь по меньшей мере приблизительно 75 или 80% гомологии с природной последовательностью области Fc и/или с областью Fc исходного полипептида, и более предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 90% гомологии с ней, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95% гомологии с ней, даже более предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 96%, 97%, 98% или 99% гомологии с ней. Термин «природный» или «исходный» относится к немодифицированному полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность Fc. Исходный полипептид может содержать природную последовательность области Fc или область Fc с предсуществующими модификациями аминокислотной последовательности (такими как добавления, делеции и/или замены).

Термины «рецептор Fc» или «FcR» используют для описания рецептора, который связывается с областью Fc антитела. Рецептор Fc представляет собой белок, обнаруженный на поверхности определенных клеток - включая, среди прочих, В-лимфоциты, фолликулярные дендритные клетки, клетки естественные киллеры, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и тучные клетки - которые вносят вклад в защитные функции иммунной системы. Его наименование происходит из специфичности его связывания для области Fc (фрагмента поддающейся кристаллизации области) антитела.

Несколько функций антитела опосредованы рецепторами Fc. Например, рецепторы Fc связываются с антителами, которые прикрепляются к инфицированным клеткам или проникающим патогенам. Их активность стимулирует фагоцитирующие или цитотоксические клетки для разрушения микроорганизмов или инфицированных клеток с помощью опосредованного антителами фагоцитоза или антителозависимой опосредуемой клетками цитотоксичности. В данной области известно также, что область Fc антитела обеспечивает, чтобы каждое антитело вызывало соответствующий иммунный ответ на данный антиген, посредством связывания со специфическим классом рецепторов Fc, и другими иммунными молекулами, такими как белки комплемента. FcR определяют по их специфичности для изотипов иммуноглобулина: рецепторы Fc для антител IgG обозначены как Fc γ R, для IgE как Fc ϵ FR, для IgA как Fc α R и т.д. Поверхностные рецепторы для иммуноглобулина G присутствуют в двух отдельных классах - те, которые активируют клетки после их перекрестного связывания («активирующие FcR») и те, которые ингибируют активацию после совместного привлечения («ингибирующие FcR»).

У видов млекопитающих, определено множество различных классов рецепторов Fc IgG: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), Fc γ RIII (CD16) и Fc γ IV, например, у мышей, и FcRI, FcRIIA, B, C, FcRIIA и B, например, у человека. В то время как для Fc γ RI показана

высокая аффинность для константной области антитела и рестрицированная специфичность для изотипа, Fc γ RII и Fc γ RIII имеют низкую аффинность для области Fc IgG, но более широкий паттерн связывания изотипов (Ravetch and Kinet, 1991; Hulett and Hogarth, *Adv Immunol* 57, 1-127 (1994)). Fc γ RIV представляет собой недавно идентифицированный рецептор, консервативный у всех видов млекопитающих, с промежуточной аффинностью и рестрицированной специфичностью для подклассов (Mechetina et al., *Immunogenetics* 54, 463-468 (2002); Davis et al., *Immunol Rev* 190, 123-136 (2002); Nimmerjahn et al., *Immunity* 23, 41-51 (2005)).

Функционально существует два различных класса Fc-рецепторов: активирующие и ингибирующие рецепторы, которые передают свои сигналы через иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) или иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM), соответственно (Ravetch, in *Fundamental Immunology* W. E. Paul, Ed. (Lippincott-Raven, Philadelphia, (2003); Ravetch and Lanier, *Science* 290, 84-89 (2000)). Парная экспрессия активирующих и ингибирующих молекул на одной и той же клетке является ключом для получения сбалансированного иммунного ответа. Кроме того, известно, что для рецепторов Fc IgG показаны значительные различия их аффинности для индивидуальных изотипов антител, делающие конкретные изотипы более строго регулируемы, чем другие (Nimmerjahn et al., 2005).

В одном варианте осуществления изобретения, FcR представляет собой природную последовательность FcR человека. В другом варианте осуществления, FcR, включая FcR человека, связывает антитело IgG (рецептор гамма) и включает рецепторы подклассов Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII, включая аллельные варианты и формы альтернативного сплайсинга этих рецепторов. Рецепторы Fc γ RII включают Fc γ RIIA («активирующий рецептор») и Fc γ RIIB («ингибирующий рецептор»), имеющие сходные аминокислотные последовательности, которые отличаются в первую очередь своими цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор Fc γ RIIA содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) в цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор Fc γ RIIB содержит иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM) в цитоплазматическом домене (см. обзор в Daron, *Annu Rev Immunol*, 15, 203-234 (1997); обзор FcR приведен в Ravetch and 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), Nimmerjahn and Ravetch 2006, Ravetch Fc Receptors in *Fundamental Immunology*, ed William Paul 5th Ed. содержание каждого из которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки).

Термин «фармацевтическая композиция» относится к комбинации действующего вещества с носителем, инертным или активным, делающим композицию особенно подходящей для диагностического или терапевтического использования *in vivo* или *ex vivo*.

В рамках изобретения, «фармацевтически приемлемый носитель» включает все без исключения растворители, диспергирующие среды, покрытия, антибактериальные и

противогрибковые средства, изотонические и замедляющие абсорбцию средства, и т.п., которые являются физиологически совместимыми. «Фармацевтически приемлемый носитель», после введения субъекту или нанесения на тело субъекта, не вызывает нежелательных физиологических эффектов. Носитель в фармацевтической композиции должен являться «приемлемым» также в том смысле, что он является совместимым с активным ингредиентом и может являться способным стабилизировать его. Одно или несколько солюбилизирующих средств можно использовать в качестве фармацевтических носителей для доставки действующего вещества. Примеры фармацевтически приемлемого носителя включают, но без ограничения, биосовместимые носители, адъюванты, добавки и разбавители, чтобы сделать композицию применимой в качестве лекарственной формы. Примеры других носителей включают коллоидный оксид кремния, стеарат магния, целлюлозу и лаурилсульфат натрия. Дополнительные приемлемые фармацевтические носители и разбавители, так же как фармацевтическая необходимость их использования, описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences. Предпочтительно, носитель является приемлемым для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, посредством инъекции или инфузии). Терапевтические соединения могут включать одну или несколько фармацевтически приемлемых солей. «Фармацевтически приемлемая соль» относится к соли, которая сохраняет желательную биологическую активность исходного соединения и не оказывает никаких нежелательных токсикологических эффектов (см., например, Berge, S. M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19).

Термин «цитотоксическое средство», в рамках изобретения, относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает функцию клеток и/или вызывает разрушение клеток. Термин предназначен для включения радиоактивных изотопов (например, At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32 и радиоактивных изотопов Lu), химиотерапевтических средств и токсинов, таких как низкомолекулярные токсины или ферментно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, включая их фрагменты и/или варианты.

«Химиотерапевтическое средство» представляет собой химическое соединение, которое можно использовать для лечения злокачественных опухолей. Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид (ЦИТОКСАН™); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилломеламин; ацетогинины (особенно буллатацин и буллатацинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги, KW-2189 и СВИ-ТМ1); элеутеробин; панкреастатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые иприты,

такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид мехлорэтаминооксида, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднемустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как эндииновые антибиотики (например, калихеамицин, см., например, Agnew Chem. Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994); динемидин, включая динемидин А; эсперамицин; так же как хромофор неокарциностатина и родственные хромофоры хромопротеинов - эндииновые антибиотики), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, сактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (включая морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марселломицин, митомицины, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиروмицин, пурамицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин, 5-FU; андрогены, такие как калюстерон, пропионат дромостанолон, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; средства, подавляющие функции надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; компенсатор фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; гликозид альдофосфамида; аминоклевулиновую кислоту; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демекольцин; диазиквон; элформитин; ацетат эллиптиния; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидамин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; ризоксин; сизофуран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангвидин); уретан; виндезин; декарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ага-С»); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например, паклитаксел (ТАКСОЛ®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) и доксетаксел (ТАКСОТЕР®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навелбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоклутетин; кселода; ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноевую кислоту; капецитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из

вышеуказанных. В это определение включены также противогормональные средства, функционирующие для регуляции или ингибирования действия гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены, включая например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (фарестон); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, леупролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеуказанных.

В рамках изобретения, «лечение» или «обработка» относится к введению соединения или средства субъекту, имеющему нарушение или подверженному риску развития нарушения, с целью излечения, облегчения, улучшения, устранения, замедления начала, предотвращения или смягчения нарушения, симптома нарушения, состояния заболевания, вторичного по отношению к нарушению, или предрасположенности к нарушению.

Термины «предотвращать», «предотвращающий», «предотвращение», «профилактическое лечение» и т.п. относятся к уменьшению вероятности развития нарушения или состояния у субъекта, который не имеет нарушения или состояния, но подвержен риску развития или является чувствительным к развитию нарушения или состояния.

«Субъект» обозначает человека и не относящегося к человеку животного. Примеры не относящегося к человеку животного включают всех позвоночных, например, млекопитающих, таких как не относящиеся к человеку млекопитающие, не относящиеся к человеку приматы (в частности высшие приматы), собака, грызун (например, мышь или крыса), морская свинка, кошка и кролик, и не относящиеся к млекопитающим животные, такие как птицы, амфибии, рептилии и т.д. В одном варианте осуществления, субъект представляет собой человека. В другом варианте осуществления, субъект представляет собой экспериментальное не относящееся к человеку животное или животное, подходящее в качестве модели заболевания.

«Эффективное количество» относится к количеству активного соединения/средства, необходимому для оказания терапевтического эффекта на подвергаемого лечению субъекта. Эффективные дозы могут меняться, как понятно специалисту в данной области, в зависимости от типов подвергаемых лечению состояний, способа введения, использования наполнителя и возможности совместного использования с другим терапевтическим лечением. Терапевтически эффективное количество комбинации для лечения неопластического состояния представляет собой количество, которое может вызывать, например, уменьшение объема опухоли, уменьшение количества очагов опухоли или замедление роста опухоли, по сравнению с не подвергнутыми лечению животными.

Как описано в настоящем описании, представлен ряд диапазонов значений. Понятно, что каждое промежуточное значение, до десятой единицы нижнего предела, если контекст явно не требует иного, между верхним и нижним пределами этого

диапазона, также конкретно описано. Каждый меньший диапазон между любым указанным значением или промежуточным значением в указанном диапазоне и любым другим указанным или промежуточным значением в этом указанном диапазоне включен в изобретение. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут быть, независимо, включены или исключены в диапазоне, и каждый диапазон, в котором любой, никакой или оба предела включены в меньшие диапазоны, также включен в изобретение, с учетом любого конкретно исключенного предела в указанном диапазоне. Когда указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключаящие любой или оба из этих включенных пределов, также включены в изобретение.

Термин «приблизительно», как правило, относится к плюс или минус 10% от указанного количества. Например, «приблизительно 10%» может обозначать диапазон от 9% до 11%, и «приблизительно 1» может обозначать 0,9-1,1. Другие значения «приблизительно» могут быть очевидными из контекста, такого как округление, так, например, «приблизительно 1» может также обозначать от 0,5 до 1,4.

II. Полипептиды и антитела

Как описано в настоящем описании, настоящее изобретение относится к выделенным полипептидам, имеющим последовательности вариантов Fc IgG человека (таких как Fc hIgG1). В одном варианте осуществления, область Fc включает одну или несколько замен аминокислотной последовательности Fc hIgG1. Без ограничения, иллюстративные области Fc IgG1 представлены ниже и на ФИГ. 16. В последовательностях, аминокислотные остатки в положениях 236, 239, 330, 332, 428 и 434 в каждой последовательности выделены жирным шрифтом, в то время как аминокислотные замены подчеркнуты. Нумерация остатков следует системе нумерации EU, и первый остаток, А, соответствует положению 118 согласно системе нумерации EU.

Дикий тип:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 1)

GAALIE (G236A/A330L/I332E):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELL**A**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP**LPE**EKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 2)

GAALIE/LS (G236A/A330L/I332E/M428L/N434S):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA

VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP
 ELLAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVY
 TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQQGNVFSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 3)

GASDALIE (G236A/A330L/I332E):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP
 ELLAGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQV
 YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 4)

Аминокислотный состав полипептида, описанного в настоящем описании, может меняться без нарушения способности полипептида связывать соответствующий рецептор и запускать соответствующий клеточный ответ. Например, он может содержать одну или несколько консервативных аминокислотных замен. Консервативная модификация или функциональный эквивалент пептида, полипептида или белка, описанного по настоящему изобретению, относится к полипептидному производному пептида, полипептида или белка, например, к белку, имеющему одно или несколько из точечных мутаций, вставок, делеций, укорочений, к слитому белку или к их комбинации. Он в основном сохраняет активность исходного пептида, полипептида или белка (таких как описанные по настоящему изобретению). Как правило, консервативная модификация или функциональный эквивалент является по меньшей мере на 60% (например, на любое количество между 60% и 100%, включительно, например, на 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% и 99%) идентичным исходному (например, SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4). Соответственно, в объем настоящего изобретения включены области Fc, имеющие одно или несколько из точечных мутаций, вставок, делеций, укорочений, слитый белок (например, Fv, sFv или другие варианты антител, как описано ниже), или их комбинация, так же как тяжелые цепи или антитела, имеющие вариант области Fc.

В рамках изобретения, процент гомологии между двумя аминокислотными последовательностями является эквивалентным проценту идентичности между двумя последовательностями. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, разделяемых последовательностями (т.е., % гомологии = # идентичных положений/общее # положений x 100), принимая во внимание количество пропусков и длину каждого пропуска, которые необходимо вносить для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно осуществлять с использованием математического алгоритма, как описано в неограничивающих примерах ниже.

Процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями

можно определять с использованием алгоритма E. Meyers and W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)), встроенного в программу ALIGN (версии 2.0), с использованием таблицы весов замен остатков PAM120, штрафа за удлинение пропуска 12 и штрафа за делецию 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определять с использованием алгоритма Нидлмана и Вунша (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)), встроенного в программу GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступного на www.gcg.com), с использованием либо матрицы Blossum 62, либо матрицы PAM250, и штрафа за внесения пропуска 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4, и штрафа за удлинение пропуска 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Дополнительно или альтернативно, последовательности белка по настоящему изобретению можно, кроме того, использовать в качестве «запрашиваемой последовательности» для проведения поиска в публичных базах данных, например, для идентификации родственных последовательностей. Такие поиски можно проводить с использованием программы XBLAST (версии 2.0) от Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Поиски белков BLAST можно проводить с использованием программы XBLAST, количества баллов=50, длины слова=3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам по изобретению. Для получения выравниваний с пропусками для целей сравнения, можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST, можно использовать параметры соответствующих программ по умолчанию (например, XBLAST и NBLAST). (См. www.ncbi.nlm.nih.gov).

В рамках изобретения, термин «консервативные модификации» относится к аминокислотным модификациям, которые не подвергают значительному влиянию или изменению характеристики связывания антитела, содержащего аминокислотную последовательность. Такие консервативные модификации включают замены, добавления и делеции аминокислот. Модификации можно вносить в антитело по изобретению стандартными способами, известными в данной области, такими как сайт-направленный мутагенез и опосредованный ПЦР мутагенез. Консервативные аминокислотные замены представляют собой замены, при которых аминокислотный остаток заменяют на аминокислотный остаток, имеющий сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, определены в данной области. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

«Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменяют на аминокислотный остаток, имеющий сходную боковую цепь. Таким образом, по прогнозам не являющийся необходимым аминокислотный остаток, например, в SEQ ID NO: 2 или 3, предпочтительно, заменяют на другой аминокислотный остаток из того же самого семейства боковых цепей. Альтернативно, мутации можно вводить случайным образом на протяжении всех или части последовательностей, например, посредством насыщающего мутагенеза, и полученные мутанты можно подвергать скринингу по способности связываться с соответствующим рецептором и запускать соответствующий клеточный ответ, для идентификации мутантов, сохраняющих активность, как описано ниже в примерах. Примеры консервативных аминокислотных замен в положениях, отличных от положений 236, 239, 330, 332, 428 и 434, можно обнаружить в Патенте США 9803023, Патенте США 9663582 и US20170349662, содержание которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

Полипептид, как описано по настоящему изобретению, можно получать в форме рекомбинантного полипептида. Для получения рекомбинантного полипептида, нуклеиновую кислоту, кодирующую его (например, SEQ ID NO: 2 или 3), можно соединять с другой нуклеиновой кислотой, кодирующей партнера по связыванию, например, глутатион-S-трансферазу (GST), эпитопную метку бх-His, или белок гена 3 M13. Полученная слитая нуклеиновая кислота экспрессирует в подходящих клетках-хозяевах слитый белок, который можно выделять способами, известными в данной области. Выделенный слитый белок можно дополнительно обрабатывать, например, посредством ферментного расщепления, для удаления партнера по слиянию и получения рекомбинантного полипептида по настоящему изобретению.

Варианты антител, имеющие вышеописанные варианты Fc, входят в объем изобретения. Дополнительные варианты последовательностей антител, имеющие улучшенную аффинность, можно получать с использованием способов, известных в данной области, и они включены в объем изобретения. Например, аминокислотные замены можно использовать для получения антител с дополнительно улучшенной аффинностью. Альтернативно, оптимизацию кодонного состава нуклеотидной последовательности можно использовать для улучшения эффективности трансляции в системах экспрессии для продукции антитела.

В конкретных вариантах осуществления, антитело по изобретению содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3. Одна или несколько из этих последовательностей CDR содержат указанные аминокислотные последовательности, основанные на предпочтительных антителах, описанных в настоящем описании, или их консервативные модификации, и при этом антитела сохраняют желательные функциональные свойства (например, нейтрализацию патогена, такого как множество штаммов вирусов HIV-1). Сходным

образом, антитело по изобретению может содержать область Fc предпочтительных антител, описанных в настоящем описании, например, SEQ ID NO: 2 или 3, ее часть, или их консервативные модификации. Один или несколько аминокислотных остатков внутри областей CDR или не относящихся к CDR областей антитела по изобретению можно заменять на другие аминокислотные остатки из того же самого семейства боковых цепей, и измененное антитело можно тестировать по сохранению функции с использованием функциональных анализов, описанных в настоящем описании. Аналогичным образом, вариант области Fc, описанный в настоящем описании, может иметь одну или несколько консервативных аминокислотных замен.

По настоящему изобретению предусмотрены другие модификации антитела. Например, антитело может быть связано с цитотоксическим средством, химиотерапевтическим средством или с одним из множества небелковых полимеров, например, полиэтиленгликолем, полипропиленгликолем, полиоксикалленами, или сополимерами полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля. Антитело можно также заключать в микрокапсулы, полученные, например, посредством способов коацервации или посредством межповерхностной полимеризации (например, микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатина и микрокапсулы из поли-(метилметакрилата), соответственно), в коллоидные системы доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы), или в макроэмульсии. Такие способы описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980).

В конкретных вариантах осуществления, антитела по описанному изобретению являются биспецифическими и могут связываться с двумя различными эпитопами одного антигена. Другие такие антитела могут объединять первый антигенсвязывающий участок с участком связывания для второго антигена. Биспецифические антитела также можно использовать для локализации цитотоксических средств в инфицированных клетках. Биспецифические антитела можно получать в форме полноразмерных антител или фрагментов антител (например, биспецифические антитела F(ab')₂). См., например, WO 96/16673, Патент США No. 5837234, WO98/02463, Патент США No. 5821337 и Mouquet et al., Nature. 467, 591-5 (2010).

Способы получения биспецифических антител известны в данной области. Традиционно, получение полноразмерных биспецифических антител основано на совместной экспрессии двух пар тяжелая цепь-легкая цепь иммуноглобулинов, где две цепи обладают различной специфичностью (см., например, Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)). Сходные способы описаны, например, в WO 93/08829, Trauneker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991) и см. также; Mouquet et al., Nature. 467, 591-5 (2010). Способы получения биспецифических антител из фрагментов антител также описаны в литературе. Например, биспецифические антитела можно получать с использованием химического связывания. См. Brennan et al., Science, 229: 81 (1985).

Как правило, антитела, используемые или описанные по настоящему изобретению,

можно получать с использованием общепринятой технологии гибридомы или получать рекомбинантным способом с использованием векторов и способов, доступных в данной области. Человеческие антитела можно также получать посредством активированных *in vitro* В-клеток (см., например, Патенты США No. 5567610 и 5229275). Общие способы молекулярной генетики и геной инженерии, которые можно использовать по настоящему изобретению, описаны в современных редакциях *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition)* Cold Spring Harbor Lab. press, 2012), *Gene Expression Technology (Methods in Enzymology, Vol. 185, edited by D. Goeddel, 1991. Academic Press, San Diego, CA)*, «*Guide to Protein Purification*» in *Methods in Enzymology* (M.P. Deutscher *et al.* (1990) Academic Press, Inc.); *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis *et al.* 1990. Academic Press, San Diego, CA), *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 2nd Ed.* (R.I. Freshney. 1987. Liss, Inc. New York, NY), и *Gene Transfer and Expression Protocols*, pp. 109-128, ed. E.J. Murray, The Humana Press Inc., Clifton, N.J.). Реагенты, клонирующие векторы и наборы для генетической манипуляции являются доступными от коммерческих поставщиков, таких как BioRad, Stratagene, Invitrogen, ClonTech и Sigma-Aldrich Co.

Другие способы, известные в данной области для отбора антитела из библиотек с использованием технологий обогащения, включая, но без ограничения, фаговый дисплей, рибосомный дисплей (Hanes and Pluckthun, 1997, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 94: 4937-4942), бактериальный дисплей (Georgiou, *et al.*, 1997, *Nature Biotechnology* 15: 29-34) и/или дрожжевой дисплей (Kieke, *et al.*, 1997, *Protein Engineering* 10: 1303-1310), можно использовать в качестве альтернатив ранее обсуждаемым технологиям для отбора одноцепочечных антител. Одноцепочечные антитела выбирают из библиотеки одноцепочечных антител, полученных непосредственно с использованием технологии нитчатых фагов. Технология фагового дисплея известна в данной области (например, см. технологию от Cambridge Antibody Technology (CAT)), как описано в Патентах США No. 5565332; 5733743; 5871907; 5872215; 5885793; 5962255; 6140471; 6225447; 6,291650; 6492160; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915; 6593081, так же как в других членах семейства Патентов США, или заявках, по которым испрашивается приоритет GB 9206318, поданного 24 мая 1992; см. также Vaughn, *et al.* 1996, *Nature Biotechnology* 14: 309-314). Одноцепочечные антитела можно также разрабатывать и конструировать с использованием доступной технологии рекомбинантной ДНК, такой как способ амплификации ДНК (например, ПЦР), или возможно, с использованием кДНК соответствующей гибридомы в качестве матрицы.

Человеческие антитела также можно получать в трансгенных животных (например, мышях), которые являются способными продуцировать полный репертуар человеческих антител в отсутствие продукции эндогенного иммуноглобулина. Например, описано, что гомозиготная делеция гена соединительной области тяжелой цепи антитела (JH) у химерных и мутантных по зародышевой линии мышей приводит к полному ингибированию продукции эндогенных антител. Перенос массива генов человеческих

зародышевых иммуноглобулинов таким мутантным по зародышевой линии мышам приводит к продукции человеческих антител после стимуляции антигеном. См., например, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, Year in Immuno., 7:33 (1993); Патенты США No. 5545806, 5569825, 5591669 (все от GenPharm); Патент США No. 5545807; и WO 97/17852. Таких животных можно подвергать генной инженерии для продукции человеческих антител, содержащих полипептид по описанному изобретению.

Для любого известного моноклонального антитела можно обеспечивать преимущество вариантов и модификаций области Fc, описанных по настоящему изобретению, посредством слияния его антигенсвязывающего фрагмента с вариантом области/домена Fc, описанным в настоящем описании. Примеры известных терапевтических моноклональных антител могут включать любое из следующих неограничивающих антител: 3F8, 8H9, абаговомаб, абциксимаб, абитузумаб, абрилумаб, актоксумаб, адалимумаб, адекатумумаб, адуканумаб, афасевикумаб, афелимомаб, афутузумаб, алацизумаб пеголь, ald518, алемтузумаб, алирокумаб, альтумомаб пентетат, аматуксимаб, анатумомаб мафенатокс, анетумаб равтансин, анифролумаб, анрукинзумаб, аполизумаб, арцитумомаб, аскринвакумаб, аселизумаб, атезолизумаб, атинумаб, атлизумаб, аторолимумаб, авелумаб, бапинеизумаб, базиликсимаб, бавитуксимаб, бектумомаб, бегеломаб, белимумаб, бенрализумаб, бертилимумаб, бесилесомаб, бевацизумаб, безлтоксумаб, бициромаб, бимагрумаб, бимекизумаб, биватузумаб мертанзин, блеселумаб, блинатумомаб, блонтуветмаб, блосозумаб, бокоцизумаб, бразикумаб, брентуксимаб ведотин, бриакинумаб, бродалумаб, бролуцизумаб, брониктузумаб, буросумаб, кабирализумаб, канакинумаб, кантузумаб мертанзин, кантузумаб равтанзин, каплацизумаб, капромаб пендетид, карлумаб, каротуксимаб, катумаксомаб, иммуноконъюгат cBR96-доксорубицин, целелизумаб, цергутузумаб амуналейкин, цертолизумаб пегол, цетуксимаб, цитатузумаб богатокс, сиксутумаб, клазакизумаб, кленоликсимаб, кливатузумаб тетраксэтан, кодритузумаб, колтуксимаб равтанзин, конатумумаб, концизумаб, CR6261, кренезумаб, кротедумаб, дацетузумаб, даклизумаб, далотузумаб, дапиролизумаб пегол, даратумумаб, дектрекумаб, демцизумаб, денинтузумаб мафодотин, деносумаб, депатуксизумаб мафодотин, дерлотуксимаб биотин, детумомаб, динутуксимаб, диридавумаб, домагрозумаб, дорлимомаб аритокс, дрозитумаб, дулиготумаб, дупилумаб, дурвалумаб, дусигитумаб, экромексимаб, экулизумаб, эдобакомаб, эдреколомаб, эфализумаб, эфунгумаб, элделумаб, элгемтумаб, элотузумаб, элсилимомаб, эмактузумаб, эмибетузумаб, эмицизумаб, энаватузумаб, энфортумаб ведотин, энлимомаб пегол, эноблитузумаб, энокизумаб, энотикумаб, энситуксимаб, эпитумомаб цитуксетан, эпратузумаб, эренумаб, эрлизумаб, эртумаксомаб, этарацизумаб, этролизумаб, эвинакумаб, эволокумаб, эксбивирумаб, фанолесомаб, фаралимомаб, фарлетузумаб, фазинумаб, FBTA05, фелвизумаб, фезакинумаб, фибатузумаб, фиклатузумаб, фигитумумаб, фиривумаб, фланвотумаб, флетикумаб, фонтолизумаб, форалумаб, форавирумаб, фрезолимумаб, фулранумаб, футуксимаб, галканезумаб,

галиксимаб, ганитумаб, гантеноумаб, гавилимомаб, гемтузумаб озогамицин, гевокизумаб, гирентуксимаб, глембатумумаб ведотин, голимумаб, гомиликсимаб, гуселкумаб, ибализумаб, ибритутомаб тиуксетан, икрукумаб, идаруцизумаб, иговомаб, IMAV362, ималумаб, имциромаб, имгатузумаб, инклакумаб, индатуксимаб равтанзин, индусатумаб ведотин, инебилизумаб, инфликсимаб, инолимомаб, инотузумаб озогамицин, интетумумаб, ипилимумаб, иратумумаб, изатуксимаб, итолизумаб, иксекизумаб, келиксимаб, лабетузумаб, лампализумаб, ланаделумаб, ландогрозумаб, лапритуксимаб эмтанзин, лебрикизумаб, лемалезомаб, лендализумаб, лензилумаб, лерделимумаб, лексатумумаб, либивирумаб, лифастузумаб ведотин, лигелизумаб, лилотомаб сатетраксетан, линтузумаб, лирилумаб, лоделцизумаб, локиветмаб, лорвотузумаб мертанзин, лукатумумаб, лулизумаб пегол, лумиликсимаб, лумретузумаб, MAVp1, мапатумумаб, маргетуксимаб, маслимомаб, матузумаб, маврилимумаб, меполизумаб, метелимумаб, милатузумаб, минретумомаб, мирветуксимаб соравтанзин, митумомаб, могамулизумаб, монализумаб, моролимумаб, мотавизумаб, моксетумомаб пазудотокс, муромонаб-CD3, наколомаб тафенатокс, намилумаб, наптумомаб эстафенатокс, наратуксимаб эмтанзин, нарнатумаб, натализумаб, навицисизумаб, навивумаб, небакумаб, нецитумумаб, немолизумаб, нерелимомаб, несвакумаб, нимотузумаб, ниволумаб, нофетумомаб мерпентан, обилтоксаксимаб, обинутузумаб, окаратузумаб, окрелизумаб, одулимомаб, офатумумаб, оларатумаб, олокизумаб, омализумаб, онартузумаб, онтуксизумаб, опицинумаб, опортузумаб монатокс, ореговомаб, ортикумаб, отеликсизумаб, отлртузумаб, окселумаб, озанезумаб, озорализумаб, пагибаксимаб, паливизумаб, памревлумаб, панитумумаб, панкомаб, панобакумаб, парсатузумаб, пасколизумаб, пазотуксизумаб, патеклизумаб, патритумаб, пембролизумаб, пемтумомаб, перакизумаб, пертузумаб, пекселизумаб, пидилизумаб, пинатузумаб ведотин, пинтумомаб, плакулумаб, плозализумаб, погализумаб, полатузумаб ведотин, понезумаб, презализумаб, приликсимаб, притоксаксимаб, притумумаб, PRO 140, квилизумаб, ракотумомаб, радретумаб, рафивирумаб, ралпанцизумаб, рамуцирумаб, ранибизумаб, раксибакумаб, рефанезумаб, регавирумаб, реслизумаб, рилотумумаб, ринкукумаб, рисанкизумаб, ритуксимаб, ривабазумаб пегол, робатумумаб, роледумаб, ромосозумаб, ронтализумаб, ровалпитузумаб тезилин, ровелизумаб, руплизумаб, сацитузумаб говитекан, самализумаб, сапелизумаб, сарилумаб, сатумомаб пендетид, секукинумаб, серибантумаб, сетоксаксимаб, севирумаб, SGN-CD19A, SGN-CD33A, сибротузумаб, сифалимумаб, силтуксимаб, симтузумаб, сиплизумаб, сирукумаб, софитузумаб ведотин, соланезумаб, солитомаб, сонепцизумаб, сонтузумаб, стамулумаб, сулесомаб, сувизумаб, табалумаб, такатузумаб тетраксетан, тадоцизумаб, тализумаб, тамтуветмаб, танезумаб, таплитумомаб паптокс, тарекстумаб, тефибазумаб, телимомаб аритокс, тенатумомаб, тенеликсимаб, теплизумаб, тепротумумаб, тесидолумаб, тетуломаб, тезепелумаб, TGN1412, тицилимумаб, тигатузумаб, тилдракизумаб, тимолумаб, тисотумаб ведотин, TNX-650, тоцилизумаб, торализумаб, тосатоксумаб, тозитумомаб, товетумаб, тралокинумаб, трастузумаб, трастузумаб эмтанзин, TRBS07, трегализумаб, тремелимумаб, тревогрумаб,

тукотузумаб, целмолейкин, тувирумаб, ублитуksимаб, улокуплумаб, урелумаб, уртоксазумаб, устекинумаб, утомилумаб, вадастуксимаб, талирин, вандортузумаб, ведотин, ванктикумаб, вануцизумаб, вапаликсимаб, варлилумаб, вателизумаб, ведолизумаб, велтузумаб, вепалимомаб, весенкумаб, висилизумаб, вобарилизумаб, волоциксимаб, ворсетузумаб, мафодотин, вотумумаб, ксентузумаб, залутумумаб, занолимумаб, затуксимаб, зиралимумаб, золимомаб, аритокс и их комбинации.

Мишени могут содержать любую из следующих, неограничивающих мишеней: β -амилоид, 4-1BB, 5AC, 5T4, α -фетопротеин, ангиопоэтин, AOC3, B7-H3, BAFF, c-MET, c-MYC, антиген C242, C5, CA-125, CCL11, CCR2, CCR4, CCR5, CD4, CD8, CD11, CD18, CD125, CD140a, CD127, CD15, CD152, CD140, CD19, CD2, CD20, CD22, CD23, CD25, CD27, CD274, CD276, CD28, CD3, CD30, CD33, CD37, CD38, CD4, CD40, CD41, CD44, CD47, CD5, CD51, CD52, CD56, CD6, CD74, CD80, CEA, CFD, CGRP, CLDN, CSF1R, CSF2, CTGF, CTLA-4, CXCR4, CXCR7, DKK1, DLL3, DLL4, DR5, EGFL7, EGFR, EPCAM, ERBB2, ERBB3, FAP, FGF23, FGFR1, GD2, GD3, GDF-8, GPNMB, GUCY2C, HER1, HER2, HGF, HIV-1, HSP90, ICAM-1, IFN- α , IFN- γ , IgE, CD221, IGF1, IGF2, IGHE, IL-1, IL2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6R, IL-9, IL-12, IL-15, IL-15R, IL-17, IL-13, IL-18, IL-1 β , IL-22, IL-23, IL23A, интегрин, ITGA2, IGFBP2, антиген Lewis-Y, LFA-1, LOXL2, LTA, MCP-1, MIF, MS5A1, MUC1, MUC16, MSLN, миостатин, суперсемейство MMP, NCA-90, NFG, NOGO-A, Notch 1, NRP1, OX-40, OX-40L, суперсемейство P2X, PCSK9, PD-1, PD-L1, PDCD1, PDGF-R, RANKL, RHD, RON, TRN4, сывороточный альбумин, SDC1, SLAMF7, SIRP α , SOST, SHP1, SHP2, STEAP1, TAG-72, TEM1, TIGIT, TFPI, TGF- β , TNF- α , суперсемейство TNF, суперсемейство TRAIL, Toll-подобные рецепторы, суперсемейство WNT, VEGF-A, VEGFR-1, VWF, цитомегаловирус (CMV), респираторно-синцитиальный вирус (RSV), гепатит В, гепатит С, гемагглютинин вируса гриппа А, вирус бешенства, вирус HIV, вирус простого герпеса и их комбинации. Другие мишени или антигены можно обнаружить в Патенте США 9803023, Патенте США 9663582 и US20170349662, содержание которых приведено в настоящем описании.

III. Нуклеиновые кислоты

Другой аспект изобретения относится к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей последовательность, кодирующую полипептид или белок, или антитело, описанные выше. Нуклеиновая кислота относится к молекуле ДНК (например, кДНК или геномной ДНК), молекуле РНК (например, мРНК) или аналогу ДНК или РНК. Аналог ДНК или РНК можно синтезировать из аналогов нуклеотидов. Молекула нуклеиновой кислоты может являться одноцепочечной или двухцепочечной, и предпочтительно, представляет собой двухцепочечную ДНК. «Выделенная нуклеиновая кислота» относится к нуклеиновой кислоте, структура которой не является идентичной структуре никакой встречающейся в природе нуклеиновой кислоты, или структуре никакого фрагмента встречающейся в природе геномной нуклеиновой кислоты. Термин, таким образом, включает, например, (а) ДНК, которая имеет последовательность части встречающейся в природе молекулы геномной ДНК, но не является фланкированной обеими кодирующими

последовательностями, фланкирующими эту часть молекулы в геноме организма, в котором она встречается в природе; (b) нуклеиновую кислоту, вставленную в вектор или в геномную ДНК прокариоты или эукариоты таким образом, что полученная молекула не является идентичной никаким встречающимся в природе вектору или геномной ДНК; (c) отдельную молекулу, такую как кДНК, геномный фрагмент, фрагмент, полученный посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР), или фрагмент рестрикции; и (d) рекомбинантную нуклеотидную последовательность, являющуюся частью гибридного гена, т.е., гена, кодирующего слитый белок. Нуклеиновую кислоту, описанную выше, можно использовать для экспрессии полипептида, слитого белка или антитела по настоящему изобретению. Для этой цели, можно функционально связывать нуклеиновую кислоту с подходящими регуляторными последовательностями для получения экспрессирующего вектора.

Вектор относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной к транспорту другой нуклеиновой кислоты, с которой она связана. Вектор может являться способным к автономной репликации или интеграции в ДНК хозяина. Примеры вектора включают плазмидный, космидный или вирусный вектор. Вектор включает нуклеиновую кислоту в форме, пригодной для экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. Предпочтительно, вектор включает одну или несколько регуляторных последовательностей, функционально связанных с последовательностью нуклеиновой кислоты, подлежащей экспрессии.

«Регуляторная последовательность» включает промоторы, энхансеры и другие элементы для контроля экспрессии (например, сигналы полиаденилирования). Регуляторные последовательности включают последовательности, управляющие конститутивной экспрессией нуклеотидной последовательности, так же как тканеспецифические регуляторные и/или индуцируемые последовательности. Дизайн экспрессирующего вектора может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации, желательный уровень экспрессии белка или РНК и т.п. Экспрессирующий вектор можно вводить в клетки-хозяева для получения полипептида по настоящему изобретению. Промотор определяют как последовательность ДНК, направляющую РНК-полимеразу для связывания с ДНК и инициации синтеза РНК. Сильный промотор представляет собой промотор, вызывающий инициацию образования мРНК с высокой частотой.

Любой полинуклеотид, как упомянуто выше, или биологически эквивалентный полинуклеотид, доступный специалисту в данной области для той же намеченной цели, можно вставлять в подходящий экспрессирующий вектор и связывать с другими молекулами ДНК для формирования «рекомбинантных молекул ДНК», экспрессирующих этот рецептор. Эти векторы могут состоять из ДНК или РНК; для большинства целей клонирования, ДНК-векторы являются предпочтительными. Типичные векторы включают плазмиды, модифицированные вирусы, бактериофаги и космиды, искусственные хромосомы дрожжей и другие формы эпизомной или интегрированной ДНК. Полностью в

компетенции специалиста в данной области находится определение подходящего вектора для конкретного применения.

Множество экспрессирующих векторов для млекопитающих можно использовать для экспрессии вышеупомянутых Fc IgG в клетках млекопитающих. Как отмечено выше, экспрессирующие векторы могут представлять собой последовательности ДНК, необходимые для транскрипции клонированной ДНК и трансляции их мРНК в подходящем хозяине. Такие векторы можно использовать для экспрессии эукариотической ДНК во множестве хозяев, таких как бактерии, сине-зеленые водоросли, клетки растений, клетки насекомых и клетки животных. Специфически сконструированные векторы позволяют челночную передачу ДНК между хозяевами, такими как бактерии-дрожжи или бактерии-клетки животных. Соответствующим образом сконструированный экспрессирующий вектор должен иметь: точку начала репликации для автономной репликации в клетках-хозяевах, селективные маркеры, ограниченное количество применимых участков для ферментов рестрикции, потенциал для высокого количества копий и активные промоторы. Экспрессирующие векторы могут включать, но без ограничения, клонирующие векторы, модифицированные клонирующие векторы, специфически сконструированные плазмиды или вирусы. Коммерчески доступные экспрессирующие векторы, которые могут являться пригодными, включают, но без ограничения, pcDNA3.neo (Invitrogen), pcDNA3.1 (Invitrogen), pCI-neo (Promega), pLITMUS28, pLITMUS29, pLITMUS38 и pLITMUS39 (New England Biolabs), pcDNA1, pcDNA1amp (Invitrogen), pcDNA3 (Invitrogen), pMC1neo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2-neo (ATCC 37593) pBPV-1(8-2) (ATCC 37110), pdBPV-MMTneo(342-12) (ATCC 37224), pRSVgpt (ATCC 37199), pRSVneo (ATCC 37198), pSV2-dhfr (ATCC 37146), pUCTag (ATCC 37460) и IZD35 (ATCC 37565).

В объем настоящего изобретения включена также клетка-хозяин, содержащая вышеописанную нуклеиновую кислоту. Примеры включают бактериальные клетки (например, клетки *E. coli*, клетки насекомых (например, при использовании бакуловирусных экспрессирующих векторов), клетки дрожжей или клетки млекопитающих. См., например, Goeddel, (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. Для получения полипептида по настоящему изобретению, можно культивировать клетку-хозяина в среде в условиях, позволяющих экспрессию полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой по настоящему изобретению, и очищать полипептид из культивируемой клетки или среды от клетки. Альтернативно, нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению можно подвергать транскрипции и трансляции *in vitro*, например, с использованием регуляторных последовательностей промотора T7 и полимеразы T7.

Все природные Fc IgG, полученные способами генной инженерии Fc IgG и химически синтезированные Fc IgG можно использовать для практического осуществления изобретения, описанного в настоящем описании. Fc IgG, полученный способом рекомбинантной ДНК, может иметь такую же аминокислотную

последовательность, как SEQ ID NO: 2 или 3, или ее функциональный эквивалент. Термин «Fc IgG» также включает химически модифицированные варианты. Примеры химически модифицированных Fc IgG включают Fc IgG, подвергнутые конформационному изменению, добавлению или делеции сахарной цепи, и Fc IgG, с которым связано соединение, такое как полиэтиленгликоль.

Можно подтверждать функцию и эффективность полученного таким образом, полипептида/белка/антитела с использованием модели на животных, как описано ниже. Любые статистически значимые увеличение времени полужизни *in vivo*, увеличенная аффинность для рецептора FcγR (например, FcγRIIA, FcγRIIIA или FcγRIIIB), FcRn, и/или усиленная цитотоксическая активность показывает, что полипептид/белок/антитело является кандидатом для лечения нарушений, упомянутых ниже. Специалист в данной области способен сочетать и комбинировать различные исследовательские инструменты без излишнего экспериментирования. После очистки и тестирования посредством стандартных способов или в соответствии с анализами и способами, описанными в примерах ниже, полипептид/белок/антитело можно включать в фармацевтическую композицию для лечения нарушений, как описано ниже.

IV. Композиции

В объем настоящего изобретения включена композиция, содержащая пригодный носитель и одно или несколько средств, описанных выше, таких как вариант Fc IgG, родственный белок или родственное антитело. Композиция может представлять собой фармацевтическую композицию, содержащую фармацевтически приемлемый носитель, или косметическую композицию, содержащую косметически приемлемый носитель.

Композицию, в любой из форм, описанных выше, можно использовать для лечения нарушений, описанных в настоящем описании. Эффективное количество относится к количеству активного соединения/средства, необходимому для оказания терапевтического эффекта на подвергаемого лечению субъекта. Эффективные дозы могут меняться, как известно специалисту в данной области, в зависимости от типов заболеваний, подвергаемых лечению, способа введения, использования наполнителя и возможности совместного использования с другим терапевтическим лечением.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить парентерально, перорально, назально, ректально, местно или буккально. Термин «парентерально», в рамках изобретения, относится к подкожной, внутрикожной, внутривенной, внутримышечной, внутрисуставной, внутриартериальной, интрасиновиальной, интрастеральной, интратекальной, внутриочаговой или интракраниальной инъекции, так же как к любому пригодному способу инфузии.

Стерильная пригодная для инъекции композиция может представлять собой раствор или суспензию в нетоксичном приемлемом для парентерального введения разбавителе или растворителе. Такие растворы включают, но без ограничения, 1,3-бутандиол, маннит, воду, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, жирные масла общепринятым образом используют в качестве растворителя

или суспендирующей среды (например, синтетические моно- или диглицериды). Жирную кислоту, например, но без ограничения, олеиновую кислоту и ее глицеридные производные, можно использовать для получения пригодных для инъекции средств, как и природные фармацевтически приемлемые масла, такие как, но без ограничения, оливковое масло или касторовое масло, их полиоксиэтилированные варианты. Эти масляные растворы или суспензии могут также содержать спиртовой разбавитель или диспергирующее средство с длинной цепью, например, но без ограничения, карбоксиметилцеллюлозу, или сходные диспергирующие средства. Другие общепринятые поверхностно-активные средства, например, но без ограничения, TWEENS или SPANS, или другие сходные эмульгаторы или усилители биодоступности, которые обычно используют для изготовления фармацевтически приемлемых твердых, жидких или других лекарственных форм, также можно использовать с целью получения состава.

Композиция для перорального введения может представлять собой любую приемлемую для перорального введения лекарственную форму, включая капсулы, таблетки, эмульсии и водные суспензии, дисперсии и растворы. В случае таблеток, общепринятые носители включают, но без ограничения, лактозу и кукурузный крахмал. Смазывающие средства, например, но без ограничения, стеарат магния, также, как правило, добавляют. Для перорального введения в форме капсулы, применимые разбавители включают, но без ограничения, лактозу и высушенный кукурузный крахмал. Когда водные суспензии или эмульсии вводят перорально, активный ингредиент можно суспендировать или растворять в масляной фазе, объединенной с эмульгирующими или суспендирующими средствами. Если желательно, можно добавлять определенные подсластители, ароматизаторы или окрашивающие средства.

Фармацевтические композиции для местного введения по описанному изобретению можно составлять в форме растворов, мазей, кремов, суспензий, лосьонов, порошков, паст, гелей, спреев, аэрозолей или масел. Альтернативно, местные составы могут находиться в форме пластырей или повязок, пропитанных активным ингредиентом(ингредиентами), который может, необязательно, содержать один или несколько наполнителей или разбавителей. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, местные составы включают материал, который может усиливать абсорбцию или проникновение действующего вещества(веществ) через кожу или другие затронутые области. Местную композицию можно использовать для лечения воспалительных нарушений кожи, включая, но без ограничения, экзему, акне, розовые угри, псориаз, контактный дерматит и реакции на сумах ядовитый.

Местная композиция содержит безопасное и эффективное количество дерматологически приемлемого носителя, пригодного для нанесения на кожу. «Косметически приемлемые» или «дерматологически приемлемые» композиция или компонент относятся к композиции или компоненту, пригодным для использования в контакте с кожей человека без избыточной токсичности, несовместимости, нестабильности, аллергического ответа и т.п. Носитель обеспечивает доставку

действующего вещества и необязательного компонента в кожу в соответствующей концентрации(концентрациях). Носитель, таким образом, может действовать в качестве разбавителя, диспергирующего средства, растворителя, или т.п. для обеспечения нанесения и равномерного распределения активных материалов на выбранной мишени в соответствующей концентрации. Носитель может является твердым, полутвердым или жидким. Носитель может находиться в форме лосьона, крема или геля, в частности, того, который имеет достаточные густоту или предел текучести для предотвращения осаждения активных материалов. Носитель может является инертным или иметь дерматологические преимущества. Он должен также является физически и химически совместимым с активными компонентами, описанными в настоящем описании, и не должен избыточно нарушать стабильность, эффективность или другие преимущества использования, ассоциированные с композицией. Местная композиция может представлять собой косметический или дерматологический продукт в форме, известной в данной области для местного или чрескожного введения, включая растворы, аэрозоли, кремы, гели, пластыри, мазь, лосьон или пену.

V. Способы лечения

Средства, описанные выше, можно вводить субъекту для профилактического и терапевтического лечения различных нарушений, таких как неопластические нарушения, воспалительные нарушения и инфекционные заболевания. Например, средства можно использовать для лечения вирусной или бактериальной инфекции, метаболического или аутоиммунного нарушения или злокачественной опухоли, или другого нарушения пролиферации клеток.

A. Неопластические нарушения

В одном аспекте настоящее изобретение относится к лечению субъекта *in vivo* с использованием вышеописанных средств таким образом, что ингибируют рост и/или метастазирование злокачественных опухолей. В одном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу ингибирования роста и/или ограничения распространения метастазирования клеток опухоли у субъекта, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества средства, описанного выше.

Неограничивающие примеры предпочтительных злокачественных опухолей для лечения включают хронический или острый лейкоз включая острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, лимфоцитарную лимфому, рак молочной железы, рак яичника, меланому (например, метастазирующую злокачественную меланому), рак почки (например, светлоклеточную карциному), рак предстательной железы (например, невосприимчивую к гормонам аденокарциному предстательной железы), рак толстого кишечника и рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого). Кроме того, изобретение включает невосприимчивые или рецидивирующие злокачественные новообразования, рост которых можно ингибировать с использованием антител по изобретению. Примеры других злокачественных опухолей, которые можно лечить с

использованием способов по изобретению, включают рак кости, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожную или внутриглазную злокачественную меланому, рак тела матки, рак прямой кишки, злокачественную опухоль анальной области, рак желудка, рак яичка, рак тела матки, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному вагины, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, неходжскинскую лимфому, рак пищевода, рак тонкого кишечника, злокачественную опухоль эндокринной системы, злокачественную опухоль щитовидной железы, злокачественную опухоль паращитовидной железы, злокачественную опухоль надпочечника, саркому мягких тканей, злокачественную опухоль мочеиспускательного канала, злокачественную опухоль пениса, солидные опухоли у детей, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, карциному почечной лоханки, неоплазию центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, ангиогенез опухолей, опухоль оси позвоночника, глиому ствола мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидную злокачественную опухоль, плоскоклеточную злокачественную опухоль, Т-клеточную лимфому, вызванные условиями внешней среды злокачественные опухоли, включая злокачественные опухоли, индуцированные асбестом, и комбинации указанных злокачественных опухолей.

Вышеуказанное лечение можно также комбинировать с стандартными видами лечения злокачественных опухолей. Например, его можно эффективно комбинировать с режимами введения химиотерапевтического средства. В этих случаях, может являться возможным уменьшать вводимую дозу химиотерапевтического реагента (Mokyr, M. et al. (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304).

Другие антитела, которые можно использовать для активации способности хозяина к иммунному ответу, можно использовать в комбинации со средством по настоящему изобретению. Они включают молекулы, нацеленные на поверхность дендритных клеток, которые активируют функцию DC и представление антигена. Например, антитела против CD40 являются способными эффективно заменять активность Т-клетки-помощника (Ridge, J. et al. (1998) *Nature* 393: 474-478) и могут быть использованы в сочетании с мультиспецифической молекулой по настоящему изобретению (Ito, N. et al. (2000) *Immunobiology* 201 (5) 527-40). Подобным образом, антитела, нацеленные на костимулирующие молекулы Т-клеток, такие как CTLA-4 (например, Патент США No. 5811097), CD28 (Haan, J. et al. (2014) *Immunology Letters* 162:103-112), OX-40 (Weinberg, A. et al. (2000) *Immunol* 164: 2160-2169), 4-1BB (Melero, I. et al. (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685 (1997) и ICOS (Hutloff, A. et al. (1999) *Nature* 397: 262-266), или антитела, нацеленные на PD-1 (Патент США No. 8008449), PD-1L (Патенты США No. 7943743 и 8168179), также могут обеспечивать увеличенные уровни активации Т-клеток. В другом примере, мультиспецифическую молекулу по настоящему изобретению можно использовать в сочетании с антинеопластическими антителами, такими как РИТУКСАН (ритуксимаб), ГЕРЦЕПТИН (трастузумаб), БЕКСАР (тозитумомаб), ЗЕВАЛИН (ибритумомаб), КАМПАТ (алемтузумаб), ЛИМФОЦИД (эпратузумаб), АВАСТИН

(бевацизумаб) и ТАРЦЕВА (эрлотиниб), и т.п.

В. Воспалительное нарушение

Описанное изобретение относится к способам лечения у субъекта воспалительного нарушения. Термин «воспалительное нарушение» относится к нарушению, характеризующемуся аномальным или нежелательным воспалением, такому как аутоиммунное заболевание. Аутоиммунные заболевания представляют собой нарушения, характеризующиеся хронической активацией иммуноцитов в неактивирующих условиях. Примеры включают псориаз, воспалительные заболевания кишечника (например, болезнь Крона и язвенный колит), ревматоидный артрит, псориазический артрит, рассеянный склероз, волчанку, диабет типа I, первичный билиарный цирроз и трансплантацию.

Другие примеры воспалительных нарушений, которые можно лечить способами по настоящему изобретению, включают астму, инфаркт миокарда, инсульт, воспалительные дерматозы (например, дерматит, экзему, атопический дерматит, аллергический контактный дерматит, крапивницу, некротизирующий васкулит, кожный васкулит, васкулит вследствие гиперчувствительности, эозинофильный миозит, полимиозит, дерматомиозит и эозинофильный фасциит), острый респираторный дистресс-синдром, фульминантный гепатит, заболевания легких вследствие гиперчувствительности (например, пневмонит вследствие гиперчувствительности, эозинофильную пневмонию, гиперчувствительность замедленного типа, интерстициальную легочную болезнь (ILD), идиопатический пульмонарный фиброз и ILD, ассоциированную с ревматоидным артритом) и аллергический ринит. Дополнительные примеры также включают миастению, диабет с ювенильным началом, гломерулонефрит, аутоиммунный тиреоидит, анкилозирующий спондилит, системную склеродермию, острые и хронические воспалительные заболевания (например, системную анафилаксию или ответы гиперчувствительности, аллергию на лекарственное средство, аллергию на укус насекомого, отторжение аллотрансплантата и реакцию трансплантат против хозяина) и синдром Шегрена.

Субъекта, подлежащего лечению из-за воспалительного нарушения, можно идентифицировать посредством стандартных способов диагностики этого нарушения. Необязательно, у субъекта можно проверять уровень или процент одного или нескольких цитокинов или клеток в тестируемом образце, полученном от субъекта, способами, известными в данной области. Если уровень или процент равен или ниже порогового значения (которое может быть получено от нормального субъекта), субъект является кандидатом для лечения, описанного в настоящем описании. Для подтверждения ингибирования или лечения, можно оценивать и/или подтверждать уровень или процент одного или нескольких из вышеупомянутых цитокинов или клеток у субъекта после лечения.

С. Инфекционные заболевания

Настоящее изобретение также относится к лечению инфекционных заболеваний с использованием вышеописанного средства, нацеленного на антиген на или в патогене.

Примеры инфекционных заболеваний в настоящем описании включают заболевания, вызванные патогенами, такими как вирусы, бактерии, грибы, простейшие и паразиты. Инфекционные заболевания могут быть вызваны вирусами, включая аденовирус, цитомегаловирус, вирус денге, вирус Эпштейна-Барр, хантавирус, вирус гепатита А, вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус простого герпеса типа I, вирус простого герпеса типа II, вирус иммунодефицита человека, (HIV), вирус папилломы человека (HPV), вирус гриппа, вирус кори, вирус свинки, паповавирус, вирус полиомиелита, респираторно-синцитиальный вирус, вирус чумы крупного рогатого скота, риновирус, ротавирус, вирус краснухи, вирус SARS, вирус натуральной оспы, вирусный менингит и т.п. Инфекционные заболевания могут быть вызваны также бактериями, включая *Bacillus anthracis*, *Borrelia burgdorferi*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia trachomatis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Diphtheria*, *E. coli*, *Legionella*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium rickettsia*, *Mycoplasma nesisseria*, *Pertussis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. pneumonia*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Vibrio cholera*, *Yersinia pestis* и т.п. Инфекционные заболевания могут быть вызваны также грибами, такими как *Aspergillus fumigatus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Penicillium marneffeii* и т.п. Инфекционные заболевания могут быть вызваны также простейшими и паразитами, такими как хламидии, возбудители кокцидиоза, *Leishmania*, возбудители малярии, риккетсии, *Trypanosoma* и т.п.

Способ лечения можно осуществлять *in vivo* или *ex vivo*, отдельно или в сочетании с другими лекарственными средствами или терапией. Терапевтически эффективное количество можно вводить за одно или несколько введений, нанесений или дозирований, и оно не предназначено для ограничения конкретным составом или способом введения.

Средство можно вводить *in vivo* или *ex vivo*, отдельно или при совместном введении в сочетании с другими лекарственными средствами или терапией, т.е., в коктейльной терапии. в рамках изобретения, термин «совместное введение» или «вводимые совместно» относится к введению по меньшей мере двух средств или видов терапии субъекту. В некоторых вариантах осуществления, совместное введение двух или более средств/видов терапии является одновременным. В других вариантах осуществления, первое средство/терапию вводят до второго средства/терапии. Специалисту в данной области понятно, что составы и/или способы введения используемых различных средств/видов терапии могут меняться.

В способе *in vivo*, соединение или средство вводят субъекту. Как правило, соединение или средство суспендируют в фармацевтически приемлемом носителе (например, таком как, но без ограничения, физиологический солевой раствор) и вводят перорально или посредством внутривенной инфузии, или инъецируют или имплантируют подкожно, внутримышечно, интратекально, внутрибрюшинно, интравенально, интравлагинально, интраназально, внутрижелудочно, интратрахеально или внутрилегочно.

Необходимая доза зависит от выбора способа введения; характера состава; характера заболевания пациента; роста, массы, площади поверхности тела, возраста и

пола субъекта; других вводимых лекарственных средств; и решения лечащего терапевта. Подходящие дозы лежат в диапазоне 0,01-100 мг/кг. Можно ожидать также изменений необходимой дозы с учетом множества доступных соединений/средств и различной эффективности различных способов введения. Например, можно ожидать, что пероральное введение требует более высоких доз, чем введение посредством *i.v.* инъекции. Изменения этих уровней дозирования можно корректировать с использованием стандартных эмпирических способов оптимизации, как хорошо известно в данной области. Инкапсуляция соединения в пригодном носителе для доставки (например, в полимерных микрочастицах или имплантируемых устройствах) может увеличивать эффективность доставки, в частности, для пероральной доставки.

VI. Примеры

Пример 1

В этом примере описаны материалы и способы, используемые в Примерах 2-3 ниже

МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ

Линии мышей

Все эксперименты на мышах *in vivo* проводили в соответствии с федеральным законодательством и институциональными руководствами, и они одобрены институциональным комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных Rockefeller University. Мышей разводили и содержали в Comparative Bioscience Center в Rockefeller University. Следующие линии использовали для экспериментов: (i) мыши с недостаточностью FcγR (FcγR^{Hy^{1b}}), ранее разработанные и охарактеризованные в Smith, P *et al. Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 6181-6186 (2012); (ii) мыши с гуманизированным FcγR (mFcγRα^{Hy^{1b}}, *Fcgr1*^{-/-}, *hFCGR1A*⁺, *hFCGR2A*⁺, *hFCGR2B*⁺, *hFCGR3A*⁺, *hFCGR3B*⁺), полученные и подробно охарактеризованные в Smith, P *et al. Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 6181-6186 (2012); (iii) мыши с гуманизированным FcγR/FcRn (mFcγRα^{Hy^{1b}}, *Fcgr1*^{-/-}, *Fcgrt*^{-/-}, *hFCGR1A*⁺, *hFCGR2A*⁺, *hFCGR2B*⁺, *hFCGR3A*⁺, *hFCGR3B*⁺, *hFCGRT*⁺), полученные посредством скрещивания мышей с гуманизированным FcγR с мышами с гуманизированным FcRn (разработанными в Petkova, S. B. *et al. Int Immunol* 18, 1759-1769); (iv) мыши с гуманизированным FcγR/CD20 (mFcγRα^{Hy^{1b}}, *Fcgr1*^{-/-}, *hFCGR1A*⁺, *hFCGR2A*⁺, *hFCGR2B*⁺, *hFCGR3A*⁺, *hFCGR3B*⁺, *hCD20*⁺).

Анализ поверхностного плазмонного резонанса (SPR)

Аффинность связывания FcγR и FcRn с вариантами домена Fc IgG1 человека определяли посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR), с использованием описанных ранее способов (Wang, T. T. *et al. Science* 355, 395-398 (2017) и Li, T. *et al. Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 3485-3490, (2017)). Все эксперименты проводили в системе Biacore T200 SPR (GE Healthcare) при 25°C в буфере HBS-EP⁺ (pH 7,4 для FcγR, pH 6,0 для FcRn). Рекомбинантный белок G (Thermo Fisher) иммобилизовали на поверхности сенсорного чипа CM5 (GE Healthcare) с использованием химических реакций присоединения по аминогруппе при плотности 500 резонансных единиц (RU). Варианты

Fc IgG1 человека захватывали на связанной с белком G поверхности (250 нМ инъецировали в течение 60 с при 20 мкл/мин), и рекомбинантные эктодомены FcγR человека, макака-резуса или мыши (7,8125-2000 нМ; Sino Biological) или FcRn/β2 микроглобулин человека (1,95-500 нМ; Sino Biological) инъецировали через проточные ячейки при скорости потока 20 мкл/мин. Время связывания составляло 60 с, с последующей 600-с стадией диссоциации. По окончании каждого цикла, поверхность сенсора регенерировали с использованием 10 мМ глицина, pH 2,0 (50 мкл/мин; 40 с). Фоновое связывание с проточными ячейками с нулевой иммобилизацией вычитали, и константы аффинности рассчитывали с использованием программного обеспечения для оценки VIAcore T200 (GE Healthcare) с использованием модели связывания 1:1 Ленгмюра.

Модели цитотоксичности in vivo

Эксперименты по истощению тромбоцитов, CD4⁺ Т-клеток и hCD20⁺ В-клеток проводили на мышах с гуманизированным FcγR и с гуманизированным FcγR/FcRn, с использованием описанных ранее способов (Smith, P *et al. Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 6181-6186 (2012) и Wang, T. T. *et al. Science* 355, 395-398 (2017)). Эксперименты по истощению В-клеток макака-резуса включали введение (i.v.) IgG1 человека дикого типа или вариантов GAALIE (G236A/A330L/I332E) mAb 2B8 против CD20 макакам-резусам (i.v.) при 0,05 мг/кг. Частоты и количества CD20⁺ клеток анализировали в крови посредством проточной цитометрии в различных временных точках до и после введения антитела.

Экспрессия, очистка и анализ антител

Антитела получали посредством временной трансфекции клеток HEK293T или Expi293, как описано ранее в Bournazos, S. *et al. Cell* 158, 1243-1253 (2014). Антитела очищали с использованием сред для аффинной очистки сефарозы 4 Fast Flow с белком G или MabSelect SuRe LX (GE Healthcare). Очищенные белки подвергали диализу в PBS и стерилизации фильтрацией (0,22 мкм). Чистоту оценивали посредством SDS-PAGE и окрашивания кумасси, и, по оценкам, она составляла >90%. T_m белка определяли с использованием набора красителей для анализа термального сдвига белков Protein Thermal Shift Dye Kit (ThermoFisher), следуя инструкциям производителя, в термоциклере с анализом в реальном времени QuantStudio 6K Flex.

Количественная оценка уровней IgG в сыворотке

Для количественной оценки концентрации в сыворотке вариантов IgG1 человека, использовали покрытые нейтравидином планшеты (5 мкг/мл; в течение ночи). Планшеты инкубировали либо с биотинилированным антителом козы против IgG человека (очищенным абсорбцией на IgG мыши, Jackson Immunoresearch) для образцов сыворотки мыши, либо с конъюгатом IgG-Fc человека с биотином для ПК от CaptureSelect™ для образцов плазмы макака-резуса. После инкубации (60 мин при комнатной температуре), планшеты блокировали с использованием PBS+2% (масс./об.) BSA+0,05% (об./об.) Tween20 в течение 2 час. Серийно разведенные (1:3, начиная с исходного разведения 1:10) образцы сыворотки инкубировали в течение 1 час. Связывание IgG детектировали с

использованием антитела козы против IgG человека (специфического для Fc γ , 1 час; 1:5000; Jackson Immunoresearch). Планшеты проявляли с использованием набора (KPL) с двух-компонентным субстратом для пероксидазы ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином), и реакции останавливали добавлением 1 М фосфорной кислоты. Оптическую плотность при 450 нм немедленно регистрировали с использованием спектрофотометра SpectraMax Plus (Molecular Devices), и вычитали фоновую оптическую плотность для образцов отрицательного контроля.

Пример 2

Разработан вариант домена Fc (названный GASDALIE), включающий специфические мутации (G236A/S239D/A330L/I332E) в аминокислотном остове IgG1 человека. Он имеет избирательно усиленное связывание с активирующими Fc γ R человека, Fc γ RIIa и Fc γ RIIIa (Smith, P., DiLillo, D.J., Bournazos, S., Li, F. & Ravetch, J.V. Mouse model recapitulating human Fc γ receptor structural and functional diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 6181-6186 (2012)). В разнообразных моделях опосредованной антителами защиты против бактериальной и вирусной инфекции, для варианта GASDALIE домена Fc защитных mAb показана значительно усиленная защитная активность, по сравнению с IgG1 человека дикого типа. См., Smith, P., *et al. Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 6181-6186 (2012); Bournazos, S. *et al. Cell* 158, 1243-1253 (2014); Bournazos, S., *et al. J Clin Invest* 124, 725-729 (2014); и DiLillo, D.J., *et al. Nat Med* 20, 143-151 (2014).

Более важно, оценка терапевтической активности варианта GASDALIE mAb против CD20 в модели CD20+ лимфомы на мышах выявила, что этот вариант не только имел улучшенную цитотоксическую активность против CD20+ клеток лимфомы, но также стимулировал индукцию длительных ответов Т-клеток памяти, обеспечивающих защиту против последующего заражения лимфомой (DiLillo, D.J. *et al. Cell* 161, 1035-1045 (2015)). Исследования механизма выявили, что, в то время как усиленная цитотоксичность во время первичного заражения лимфомой была опосредована через усиленное привлечение Fc γ RIIIa на эффекторных лейкоцитах, подобных моноцитам и макрофагам, перекрестное связывание Fc γ RIIa на дендритных клетках стимулировало созревание дендритных клеток и индукцию ответов Т-клеток памяти, опосредующих защиту при вторичном заражении (DiLillo, D.J. *et al. Cell* 161, 1035-1045 (2015)). Совместно, эти исследования показали, улучшенную терапевтическую активность варианта GASDALIE домена Fc, достигаемую посредством избирательно усиленного связывания с Fc γ RIIa и Fc γ RIIIa человека.

Несмотря на его улучшенную эффекторную функцию Fc, для варианта GASDALIE показано значительно более короткое время полужизни *in vivo*, в первую очередь, у мышей с гуманизированным Fc γ R, и до меньшей степени, в линиях мышей с недостаточностью всех классов Fc γ R (ФИГ. 1). Этот эффект можно приписать его увеличенной аффинности для Fc γ R, так же как уменьшенной стабильности *in vivo*. Даже при комбинации с мутациями домена Fc (например, LS: M428L/N434S), увеличивающими аффинность и продлевающими время полужизни FcRn, для варианта GASDALIE домена Fc показано очень короткое время полужизни *in vivo* у не относящихся к человеку

приматов (ФИГ. 2).

Авторы настоящего изобретения разработали вариант домена Fc (названный GAALIE), который имеет все характеристики варианта GASDALIE, включая увеличенную аффинность для FcγRIIa и FcγRIIIa и усиленную цитотоксическую активность в нескольких моделях опосредованной mAb цитотоксичности, но неожиданно также поддерживает физиологическое время полужизни. В исследования, показанные ниже, авторы настоящего изобретения включили варианты домена Fc (афукозилированный и вариант S239D/I332E), которые уже оценивали у человека и показали увеличенную аффинность связывания FcγR без значительного нарушения их стабильности и времени полужизни *in vivo*. Goede, V. *et al. N Engl J Med* 370, 1101-1110 (2014); Zalevsky, J. *et al. Blood* 113, 3735-3743 (2009); и Woyach, J.A. *et al. Blood* 124, 3553-3560 (2014).

Вариант GAALIE (G236A/A330L/I332E) охарактеризован по его аффинности для всех классов FcγR человека, макака-резуса и мыши (ФИГ. 3-8), так же как по его цитотоксической эффекторной активности в моделях истощения тромбоцитов, CD4+ Т-клеток и В-клеток у мышей с гуманизированным FcγR (ФИГ. 9-12). Оценка времени полужизни варианта GAALIE у мышей с гуманизированным FcγR и у мышей с недостаточностью FcγR, так же как у макаков-резусов, выявила, что он имеет физиологическое время полужизни (ФИГ. 13-14). Кроме того, цитотоксичность *in vivo* варианта GAALIE оценивали у не относящихся к человеку приматов (макака-резуса) в модели опосредованного mAb истощения CD20+ В-клеток (ФИГ. 15).

Пример 3

Для дополнительного продления времени полужизни *in vivo* варианта GAALIE, его комбинировали с мутациями, которые увеличивают аффинность для FcRn без влияния на связывание FcγR (Zalevsky, J. *et al. Nat Biotechnol* 28, 157-159 (2010) и Grevys, A. *et al. J Immunol* 194, 5497-5508 (2015)). Эти мутации включают M428L и N434S (вариант LS, Zalevsky, J. *et al. Nat Biotechnol* 28, 157-159 (2010)), и аминокислотная последовательность полученных вариантов домена Fc представлена на ФИГ. 16. Определяли температуру плавления белка и аффинность связывания FcRn для улучшающих связывание FcγR/FcRn вариантов (ФИГ. 17-20). Кроме того, время полужизни *in vivo* этих вариантов оценивали у мышей с гуманизированным FcRn/FcγR (ФИГ. 21). Как ожидали, для GAALIE LS (G236A/A330L/I332E/M428L/N434S) показано продленное время полужизни, переведенное также в продленную и усиленную эффекторную активность Fc в модели опосредованного mAb истощения тромбоцитов у мышей с гуманизированным FcγR/FcRn (ФИГ. 22).

Пример 4

Для воспроизведения взаимодействий антител, разработанных для клинического применения с Fc человека с FcR человека, клетки В16-FUT3 инокулировали мышам с гуманизированным FcγR, линии, лишенной всех мышинных FcR, в то же время несущей трансгены всех человеческих FcγR (Smith, P., *et al. Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 6181-6186 (2012)), получая воспроизведение клеточного паттерна экспрессии FcR человека на

полностью некомпетентном мышинном фоне. Несущих опухоль В16 мышей обрабатывали нацеленными на sLeA антителами, клонов 5В1 и 7Е3, экспрессирующими подкласс hIgG1. Для обоих клонов 5В1 и 7Е3 показана сравнимая терапевтическая эффективность (ФИГ. 23А), приводящая к значительному уменьшению количества очагов метастазирования в легких. Как наблюдали для химерных человеческих-мышинных антител (данные не представлены), конструирование 5В1-hIgG1 с мутацией Fc (N297A), уничтожающей его способность привлекать FcR человека, приводит к потере терапевтического эффекта нацеленных на sLeA антител (данные не представлены).

В свете вышеописанной роли активирующих FcR в опосредовании индуцированного антителом клиренса опухоли, предпринята попытка увеличения терапевтической активности нацеленных на sLeA антител посредством увеличения их аффинности для активирующих FcR. При осуществлении этого, нацеленные на sLeA антитела hIgG1 реконструировали посредством введения трех точечных мутаций (G236A/A330L/I332E)(«GAALIE»). Точечные мутации GAALIE значительно увеличивали аффинность нацеленных на sLeA антител для двух активирующих FcR человека: hFcγRIIA и hFcγRIIA, в то же время уменьшая связывание с ингибирующим рецептором, hFcRIIB, не создавая помех для аффинности их связывания с sLeA. Для реконструированных вариантов антител 5В1 и 7Е3 показана превосходная противоопухолевая активность, по сравнению с исходным антителом с фрагментом Fc hIgG1 дикого типа (ФИГ. 24В). Эти обнаружения подкрепляют обнаружения того, что привлечение активирующих FcR является критической стадией в процессе эффективного опосредованного антителом клиренса опухоли.

Пример 5

Привлечение только hFcγRIIA является как необходимым, так и достаточным для опосредованного антителом клиренса опухоли в нескольких моделях опухолей, в то время как привлечение активирующего рецептора hFcγRIIA являлось недостаточным для опосредования клиренса опухоли. В этом исследовании, целью являлось определение того, справедливы ли эти обнаружения также на нацеленных на углеводы антител. Сравнивали противоопухолевую активность трех вариантов Fc с увеличенной аффинностью для любого из hFcγRIIA (GA), hFcγRIIA (ALIE), или обоих (GAALIE) у мышей с гуманизированным FcγR, несущих опухоль (ФИГ. 24А). Аффинность вариантов GA и ALIE Fc hIgG1 для различных FcR человека опубликована 9,34,35; для варианта GAALIE Fc показана более высокая аффинность для hFcRIIA и hFcRIIA, с уменьшенной аффинностью для hFcRIIB, и время полужизни *in vivo*, сравнимое с hIgG1, в то же время показана превосходящая способность к ADCC, по сравнению с исходным hIgG1 (данные не представлены).

Для всех трех вариантов Fc показан сравнимый противоопухолевый потенциал, который был значимо выше потенциала исходного антитела IgG1 человека дикого типа (ФИГ. 24В). Для подтверждения этих обнаружений, сравнивали противоопухолевую активность варианта 5В1-hIgG1-GAALIE Fc (с увеличенной аффинностью к обоим

активирующим FcR) в нескольких линиях трансгенных мышей, экспрессирующих FcR человека. На ФИГ. 24С показано, что вариант 5B1-hIgG1-GAALIE имеет выраженную, еще сравнимую, противоопухолевую активность не только у мышей с гуманизированным FcγR (экспрессирующих все человеческие FcγR, включая hFcγRIIA, hFcγRIIB и hFcγRIIA), но также у мышей только с hFcγRIIA и у мышей только с hFcγRIIA. Как ожидали, клиренс опухоли не наблюдали у мышей с FcR-нуль. Истощение NK по существу не препятствовало противоопухолевой активности этого нацеленного на sLeA антитела (данные не представлены), позволяя предполагать, что истощение клеток опухоли в первую очередь опосредовано эффекторными клетками, экспрессирующими hFcγRIIA и hFcRγIIA, такими как макрофаги.

Приведенные выше примеры и описание предпочтительных вариантов осуществления следует принимать как иллюстрирующие, а не ограничивающие настоящее изобретение, как определено посредством формулы изобретения. Как хорошо понятно, многочисленные изменения и комбинации признаков, указанных выше, можно использовать без отклонения от настоящего изобретения, как указано в формуле изобретения. Такие изменения не рассматривают как отклонение от объема изобретения, и все такие изменения предназначены для включения в объем следующей ниже формулы изобретения. Полное содержание всех ссылок, процитированных в настоящем описании, приведено в качестве ссылки.

1. Полипептид, содержащий вариант Fc полипептида Fc IgG1 человека, где вариант Fc (i) содержит аланин (A) в положении 236, лейцин (L) в положении 330 и глутаминовую кислоту (E) в положении 332, и (ii) не содержит аспарагиновую кислоту (D) в положении 239, и где нумерация представлена в соответствии с индексом EU по Kabat.

2. Полипептид по п.1, где вариант Fc дополнительно содержит лейцин (L) в положении 428 и серин (S) в положении 434.

3. Полипептид по п.1 или 2, где вариант Fc содержит серин (S) в положении 239.

4. Полипептид по любому из пп. 1-3, где вариант Fc содержит последовательность из SEQ ID NO: 2 или 3.

5. Антитело, содержащее полипептид по любому из пп. 1-4.

6. Антитело по п.5, имеющая специфичность для молекулы-мишени.

7. Антитело по п.6, где молекула-мишень выбрана из группы, состоящей из цитокина, растворимого фактора, молекулы, экспрессированной на патогене, молекулы, экспрессированной на клетках, и молекулы, экспрессированной на клетках злокачественных опухолей.

8. Антитело по любому из пп. 1-7, выбранное из группы, состоящей из химерного антитела, гуманизованного антитела и человеческого антитела.

9. Антитело по любому из пп. 1-8, имеющее один или несколько из следующих признаков: (1) более высокая аффинность связывания с hFcγRIIA, hFcγRIIA, hFcRn или/и hFcγRIIB, по сравнению с антителом, имеющим последовательность из SEQ ID NO: 1, (2)

более длительное время полужизни в сыворотке по сравнению с антителом, имеющим последовательность из SEQ ID NO: 4, и (3) идентичное или лучшее время полужизни, по сравнению с антителом, имеющим последовательность из SEQ ID NO:1.

10. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую полипептид или антитело по любому из пп. 1-9.

11. Экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.10.

12. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.10.

13. Способ получения полипептида или антитела, включающий культивирование клетки-хозяин по п.12 в среде в условиях, позволяющих экспрессию полипептида или антитела, кодированного нуклеиновой кислотой, и очистку полипептида или антитела из культивированной клетки или среды от клетки.

14. Фармацевтический состав, содержащий (i) полипептид или антитело по любому из пп. 1-9, или нуклеиновую кислоту по п.10, и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

15. Способ лечения воспалительного нарушения, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества полипептида или антитела по любому из пп. 1-9, или нуклеиновой кислоты по п.10.

16. Способ лечения неопластического нарушения, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества полипептида или антитела по любому из пп. 1-9, или нуклеиновой кислоты по п.10.

17. Способ лечения инфекционного заболевания, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества полипептида или антитела по любому из пп. 1-9 или нуклеиновой кислоты по п.10.

18. Применение полипептида или антитела по любому из пп. 1-9 или нуклеиновой кислоты по п.10 в изготовлении лекарственного средства для лечения воспалительного нарушения.

19. Применение полипептида или антитела по любому из пп. 1-9, или нуклеиновой кислоты по п.10 в изготовлении лекарственного средства для лечения неопластического нарушения.

20. Применение полипептида или антитела по любому из пп. 1-9, или нуклеиновой кислоты по п.10 в изготовлении лекарственного средства для лечения инфекционного заболевания.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, содержащий вариант Fc полипептида Fc IgG1 человека, где вариант Fc содержит аланин (A) в положении 236, лейцин (L) в положении 330 и глутаминовую кислоту (E) в положении 332, серин (S) в положении 239, лейцин (L) в положении 428 и серин (S) в положении 434, где нумерация представлена в соответствии с индексом EU по Kabat, и где антитело, имеющее вариант Fc, имеет более длительное время полужизни по сравнению с антителом, имеющим последовательность Fc IgG1 дикого типа SEQ ID NO: 1.

2. Полипептид по п. 1, где вариант Fc включает последовательность SEQ ID NO: 3.

3. Полипептид по п. 1 или 2, где антитело, имеющее вариант Fc, обладает усиленной цитотоксической активностью по сравнению с антителом, имеющим последовательность Fc IgG1 дикого типа SEQ ID NO: 1.

4. Антитело, содержащее полипептид по любому из пп. 1-3.

5. Антитело по п. 4, отличающееся тем, что антитело имеет специфичность для молекулы-мишени.

6. Антитело по п. 5, где молекула-мишень выбрана из группы, состоящей из цитокина, растворимого фактора, молекулы, экспрессированной на патогене, молекулы, экспрессированной на клетках, и молекулы, экспрессированной на клетках злокачественных опухолей.

7. Антитело по любому из пп. 4-6, отличающееся тем, что антитело выбрано из группы, состоящей из химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела.

8. Антитело по любому из пп. 4-6, отличающееся тем, что антитело имеет более высокую аффинность связывания с hFcγRIIA, hFcγRIIA, hFcRn или/и hFcγRIIB, по сравнению с антителом, имеющим последовательность из SEQ ID NO: 1.

9. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую полипептид по любому из пп. 1-3 или антитело по любому из пп. 4-8.

10. Экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 9.

11. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 9.

12. Способ получения полипептида или антитела, включающий культивирование клетки-хозяин по п. 11 в среде в условиях, позволяющих экспрессию полипептида или антитела, кодированного нуклеиновой кислотой, и очистку полипептида или антитела из культивированной клетки или среды от клетки.

13. Фармацевтический состав, содержащий (i) полипептид по любому из пп. 1-3, антитело по любому из пп. 4-8 или нуклеиновую кислоту по п. 9 и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

14. Способ лечения воспалительного нарушения, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества полипептида по любому из пп. 1-3, антитела по любому из пп. 4-8 или нуклеиновой кислоты по п. 9.

15. Применение полипептида по любому из пп. 1-3, антитела по любому из пп. 4-8 или нуклеиновой кислоты по п. 9 в изготовлении лекарственного средства для лечения воспалительного нарушения.

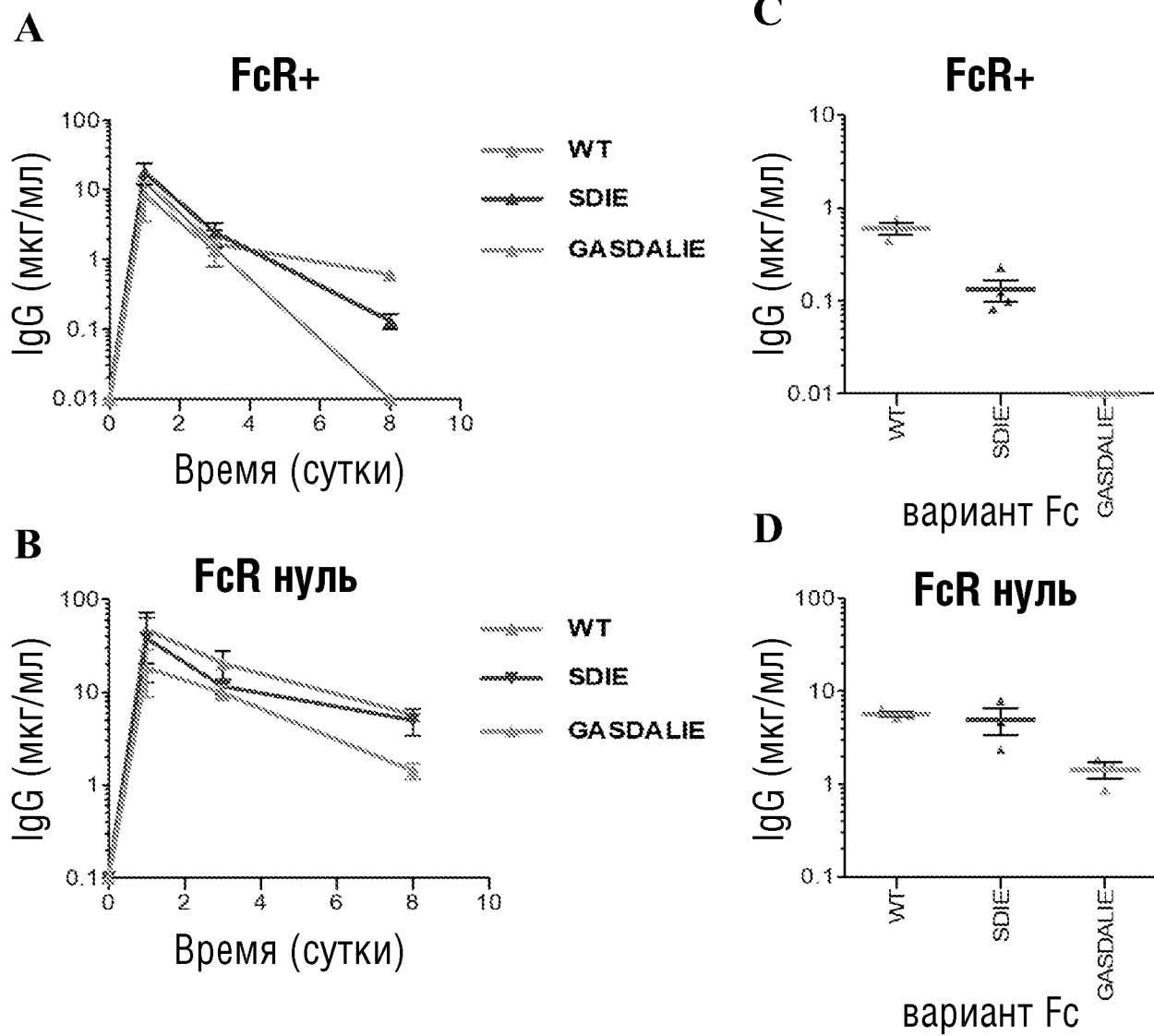
16. Способ лечения неопластического нарушения, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества полипептида по любому из пп. 1-3, антитела по любому из пп. 4-8 или нуклеиновой кислоты по п. 9.

17. Применение полипептида по любому из пп. 1-3, антитела по любому из пп. 4-8 или нуклеиновой кислоты по п. 9 в изготовлении лекарственного средства для лечения неопластического нарушения.

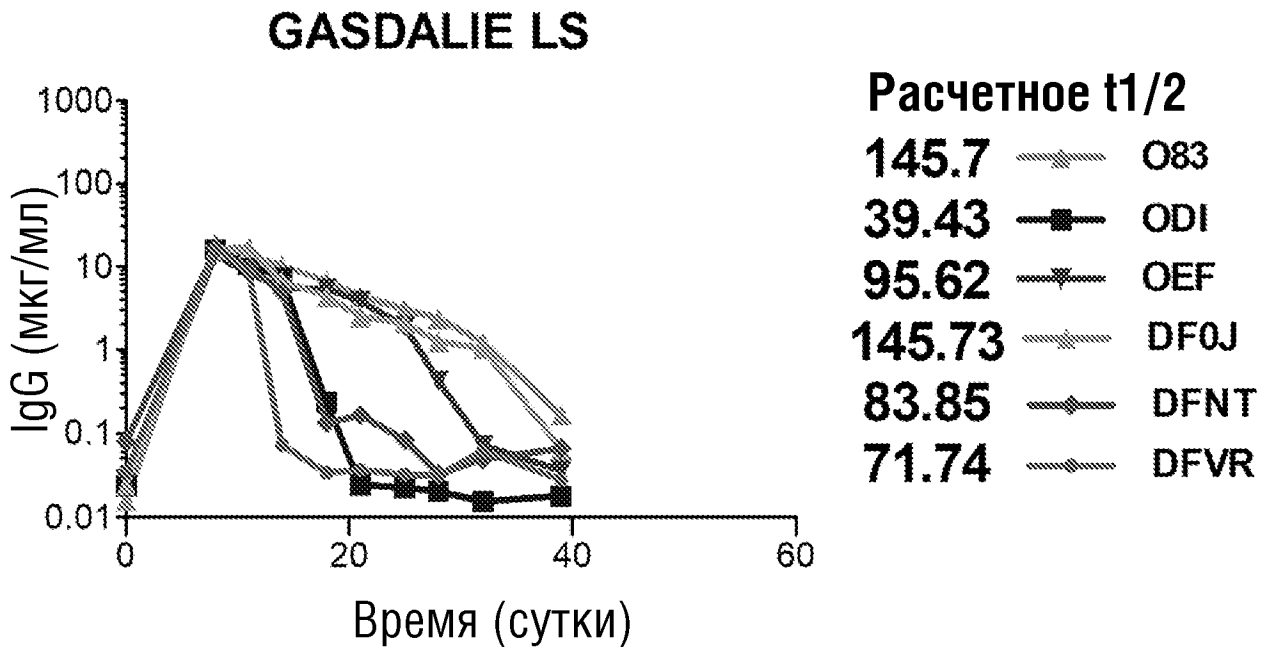
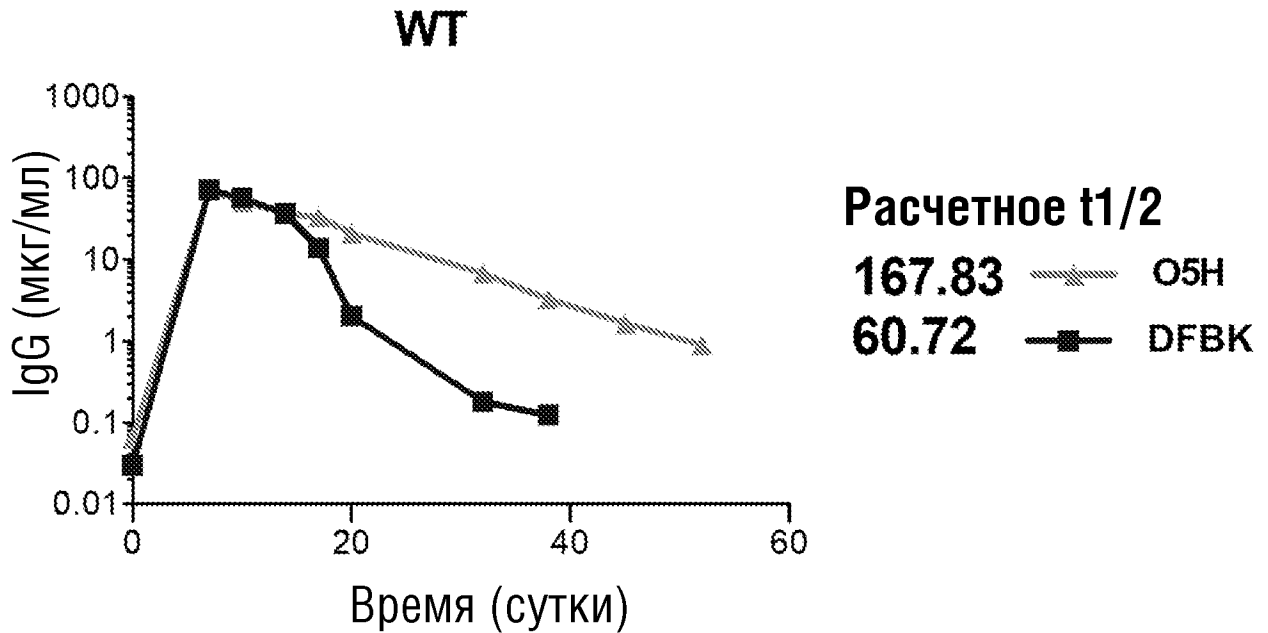
18. Способ лечения инфекционного заболевания, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества полипептида по любому из пп. 1-3, антитела по любому из пп. 4-8 или нуклеиновой кислоты по п. 9.

19. Применение полипептида по любому из пп. 1-3, антитела по любому из пп. 4-8 или нуклеиновой кислоты по п. 9 в изготовлении лекарственного средства для лечения инфекционного заболевания.

ФИГ.1А, 1В, 1С, 1D



ФИГ.2А, 2В



ФИГ.3А, 3В

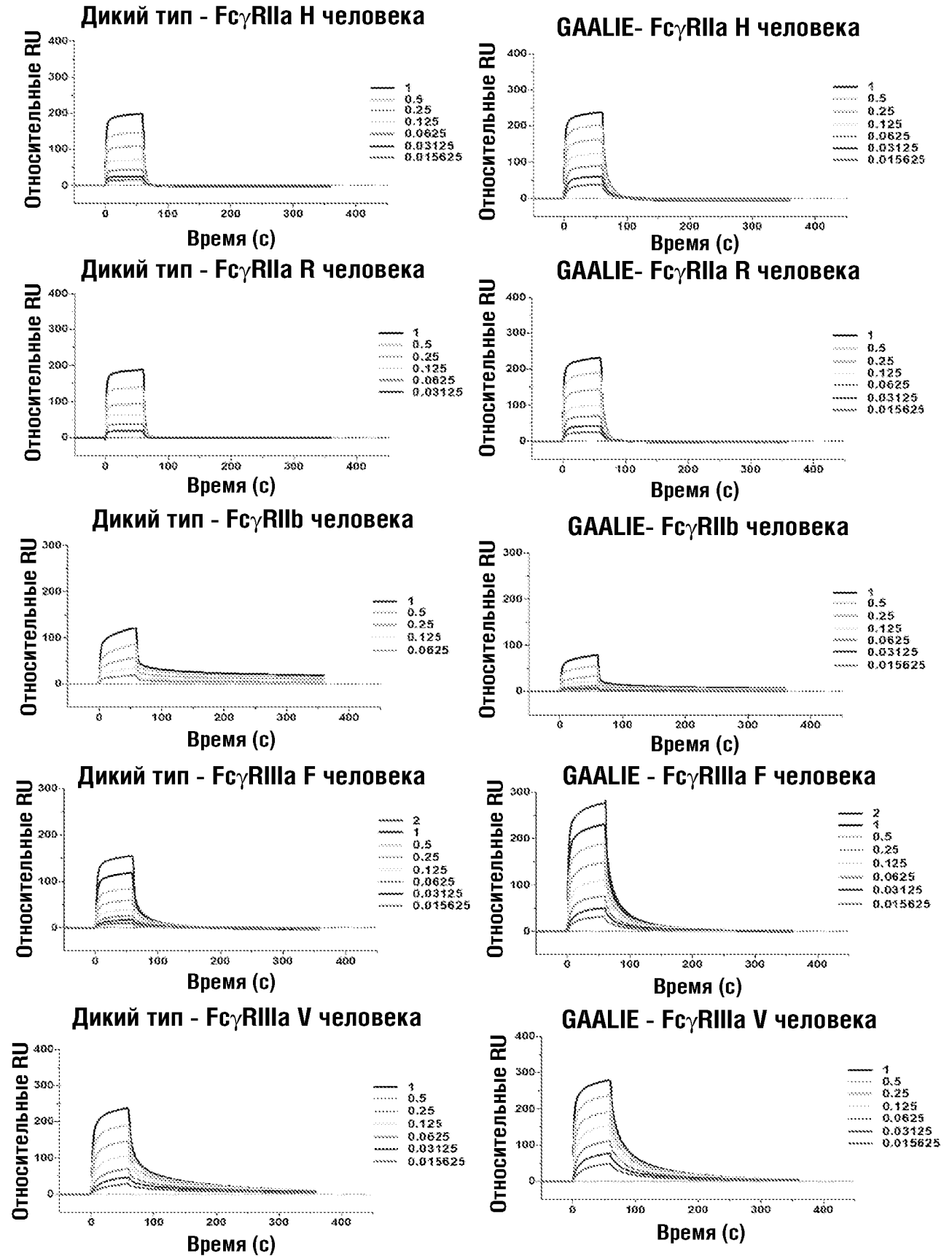
А

	FcγRIIa H	FcγRIIa R	FcγRIIb	FcγRIIIa F	FcγRIIIa V
Дикий тип	3.14×10^{-6}	2.91×10^{-6}	6.21×10^{-6}	1.43×10^{-6}	5.21×10^{-7}
SDIE	7.69×10^{-7}	3.54×10^{-7}	6.65×10^{-7}	4.75×10^{-8}	2.96×10^{-8}
GAIE	2.49×10^{-7}	2.04×10^{-7}	1.44×10^{-6}	1.62×10^{-7}	1.30×10^{-7}
GAALIE	6.22×10^{-7}	8.19×10^{-7}	1.96×10^{-5}	1.64×10^{-7}	1.31×10^{-7}
Афукозилиров.	3.13×10^{-6}	2.51×10^{-6}	5.88×10^{-6}	1.21×10^{-7}	1.22×10^{-7}

В

	FcγRIIa H	FcγRIIa R	FcγRIIb	FcγRIIIa F	FcγRIIIa V
Дикий тип	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
SDIE	4.1	8.2	9.3	30.1	17.6
GAIE	12.6	14.3	4.3	8.8	4.0
GAALIE	5.0	3.6	0.3	8.7	4.0
Афукозилиров.	1.0	1.2	1.1	11.8	4.3

ФИГ.4



ФИГ.5А, 5В

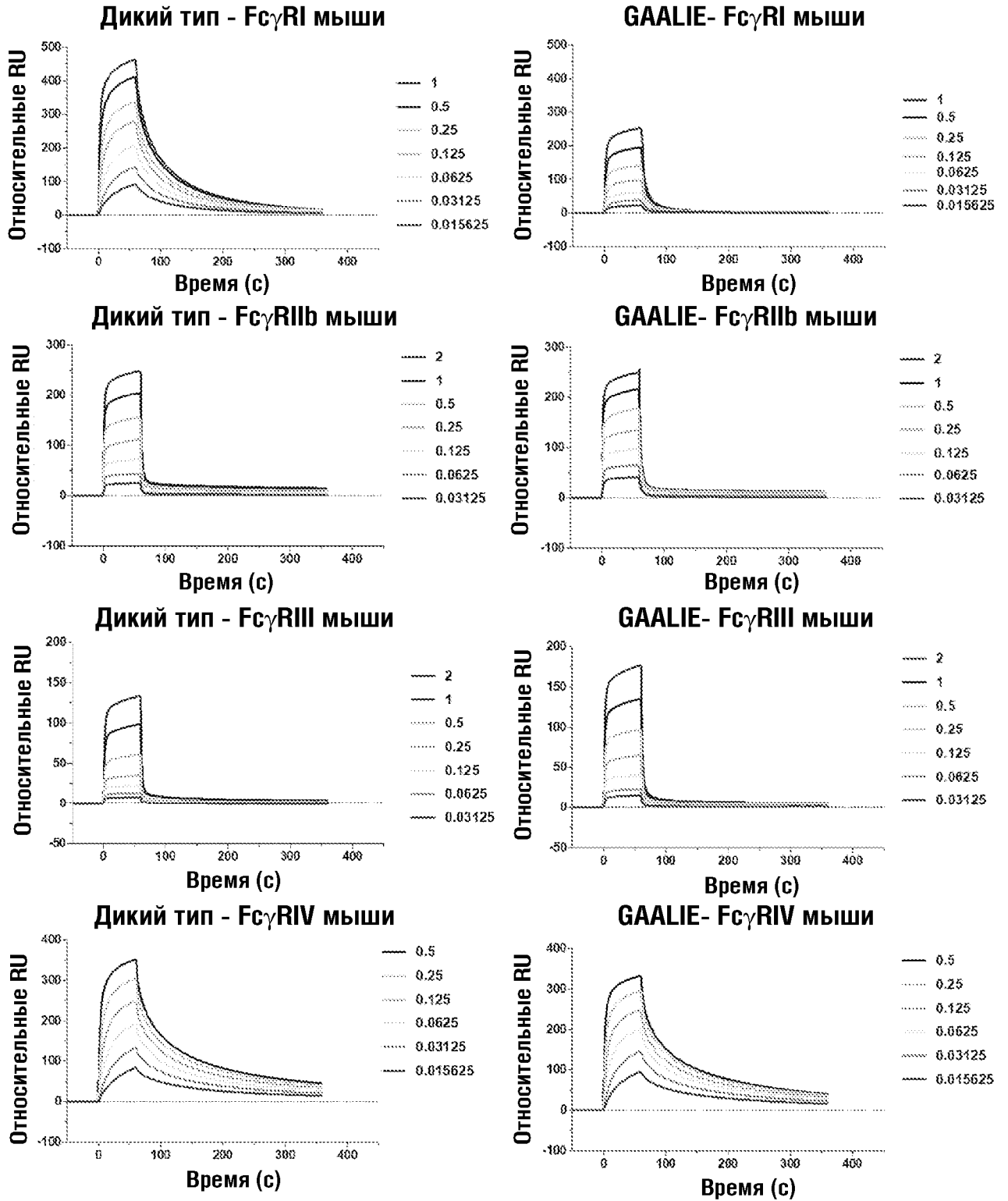
А

	FcγRI	FcγRIIb	FcγRIII	FcγRIV
Дикий тип	1.15×10^{-7}	2.41×10^{-6}	5.67×10^{-6}	2.31×10^{-7}
SDIE	1.41×10^{-8}	3.98×10^{-7}	1.08×10^{-6}	8.56×10^{-9}
GAIE	2.12×10^{-7}	1.15×10^{-6}	2.52×10^{-6}	2.58×10^{-7}
GAALIE	4.40×10^{-7}	1.62×10^{-6}	2.38×10^{-6}	2.07×10^{-7}
Афукозилиров.	9.70×10^{-8}	2.40×10^{-6}	6.43×10^{-6}	1.62×10^{-7}

В

	FcγRI	FcγRIIb	FcγRIII	FcγRIV
Дикий тип	1.0	1.0	1.0	1.0
SDIE	8.2	6.1	5.3	27.0
GAIE	0.5	2.1	2.3	0.9
GAALIE	0.3	1.5	2.4	1.1
Афукозилированный	1.2	1.0	0.9	1.4

ФИГ.6



ФИГ.7А, 7В

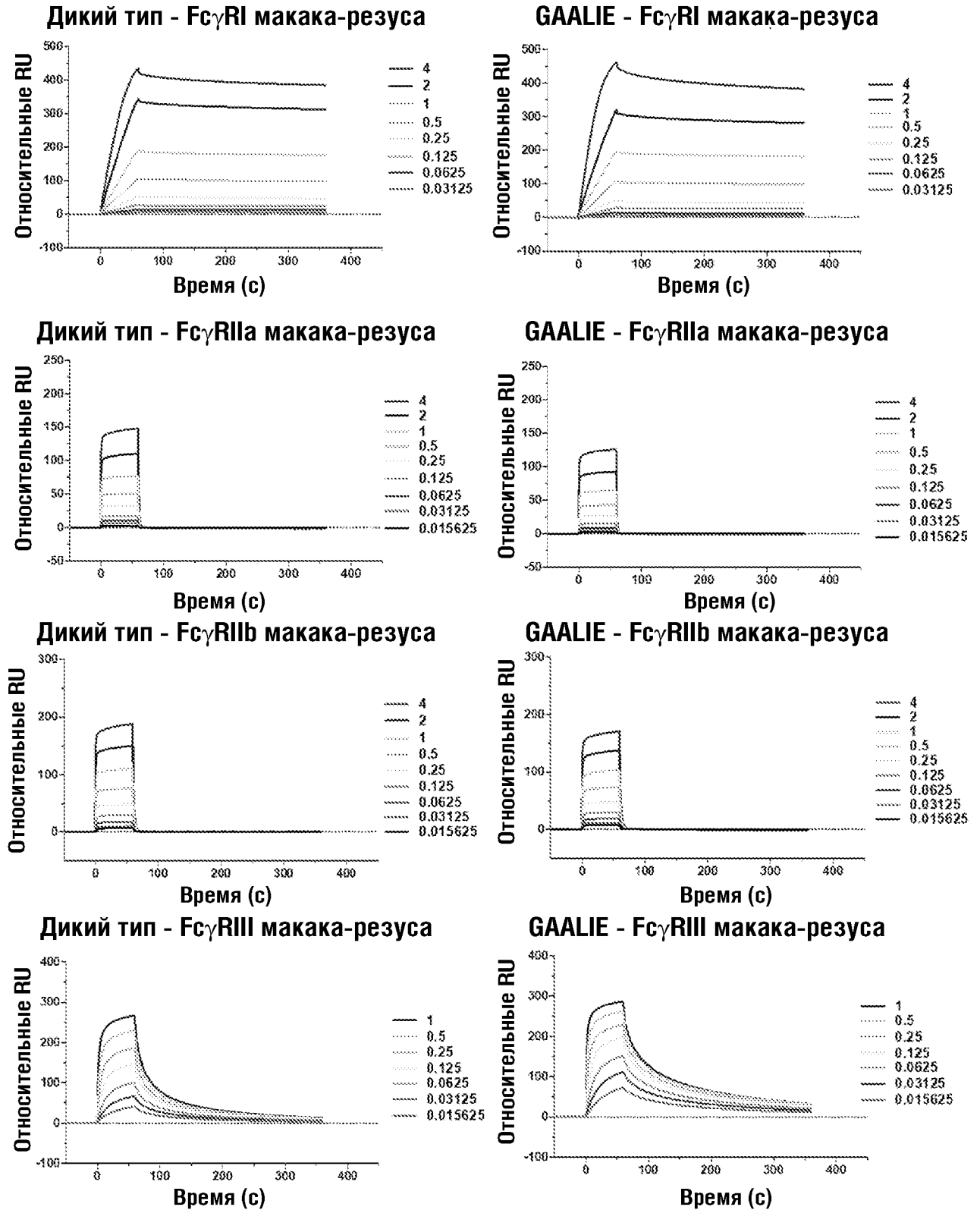
А

	FcγRI	FcγRIIa	FcγRIIb	FcγRIII
Дикий тип	4.84×10^{-10}	8.27×10^{-6}	7.94×10^{-6}	4.90×10^{-7}
SDIE	4.41×10^{-10}	6.85×10^{-7}	5.40×10^{-7}	3.00×10^{-8}
GAIE	5.10×10^{-10}	1.40×10^{-6}	1.10×10^{-6}	8.76×10^{-8}
GAALIE	4.57×10^{-10}	9.10×10^{-6}	6.92×10^{-6}	9.12×10^{-8}
Афукозилиров.	4.07×10^{-10}	8.45×10^{-6}	8.05×10^{-6}	9.76×10^{-8}

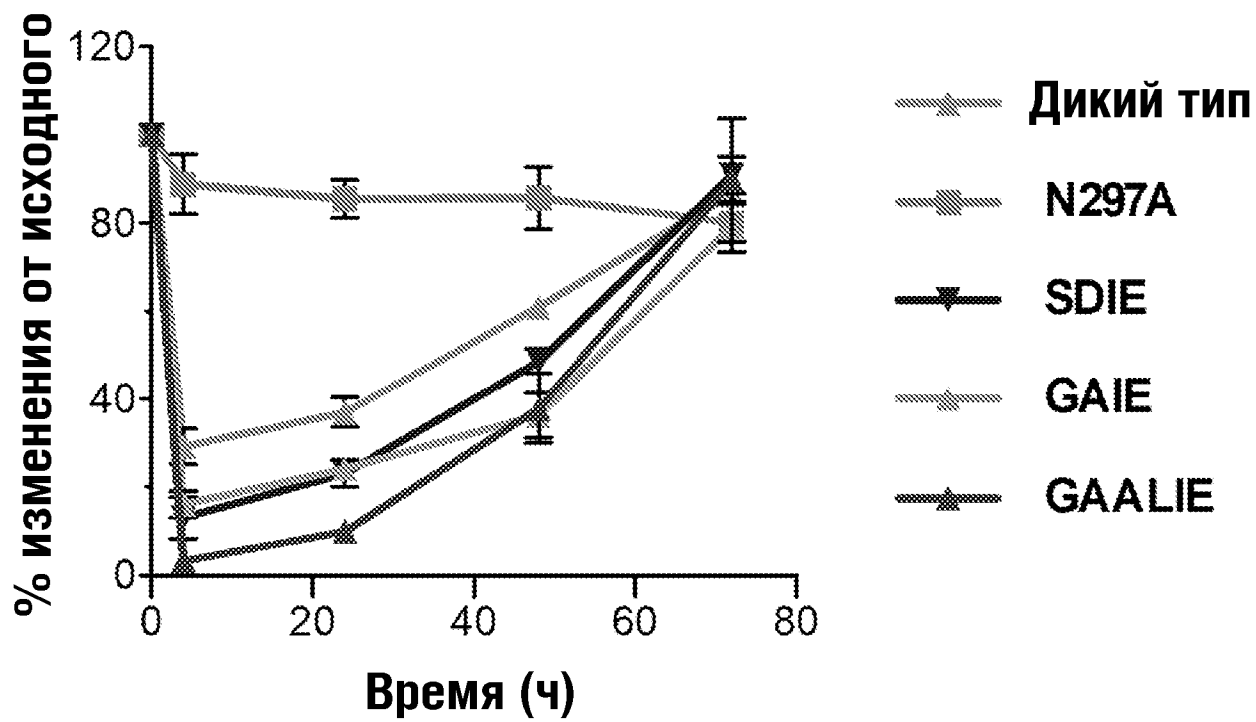
В

	FcγRI	FcγRIIa	FcγRIIb	FcγRIII
Дикий тип	1.0	1.0	1.0	1.0
SDIE	1.1	12.1	14.7	16.3
GAIE	0.9	5.9	7.2	5.6
GAALIE	1.1	0.9	1.1	5.4
Афукозилированный	1.2	1.0	1.0	5.0

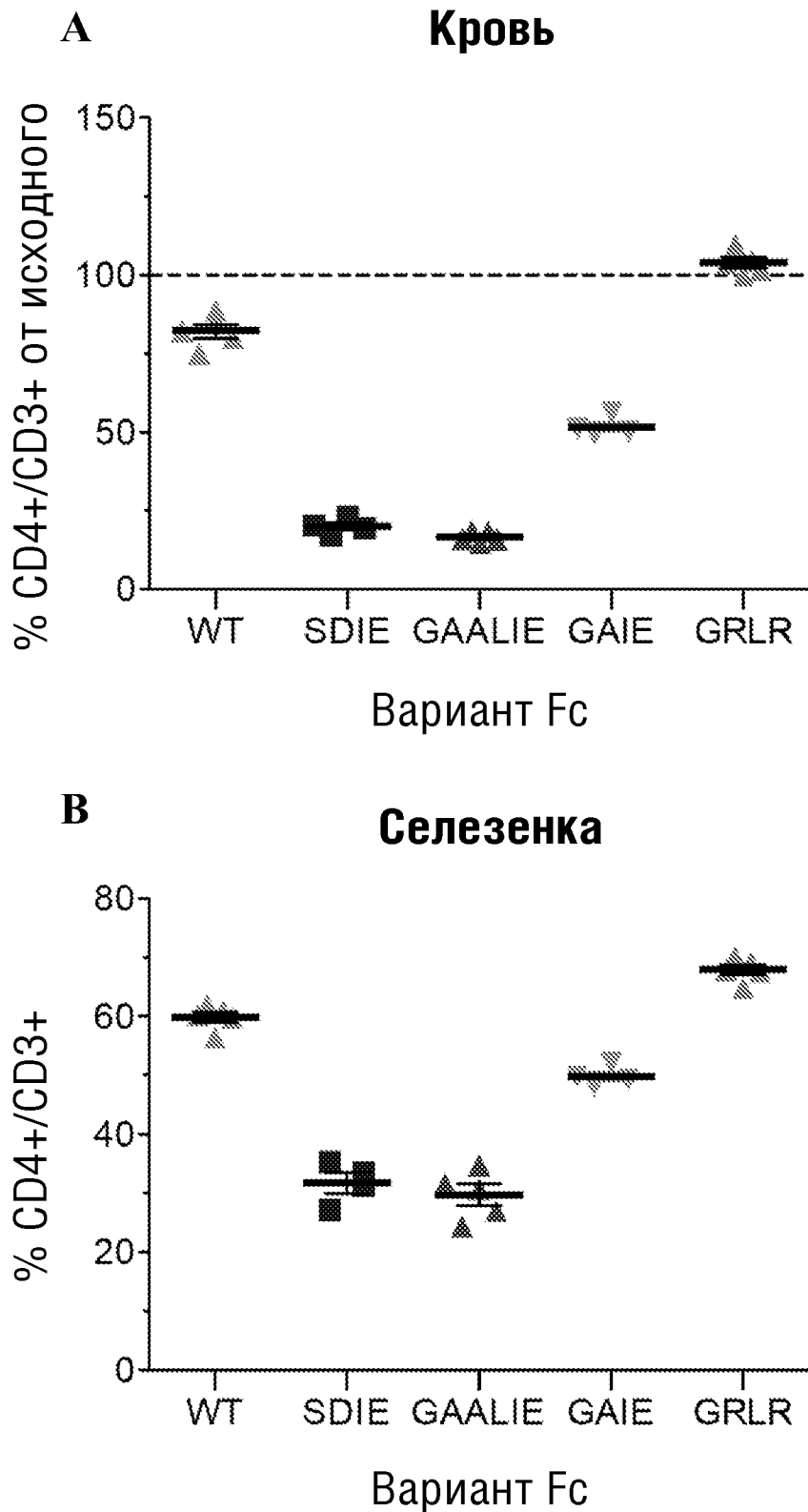
ФИГ.8



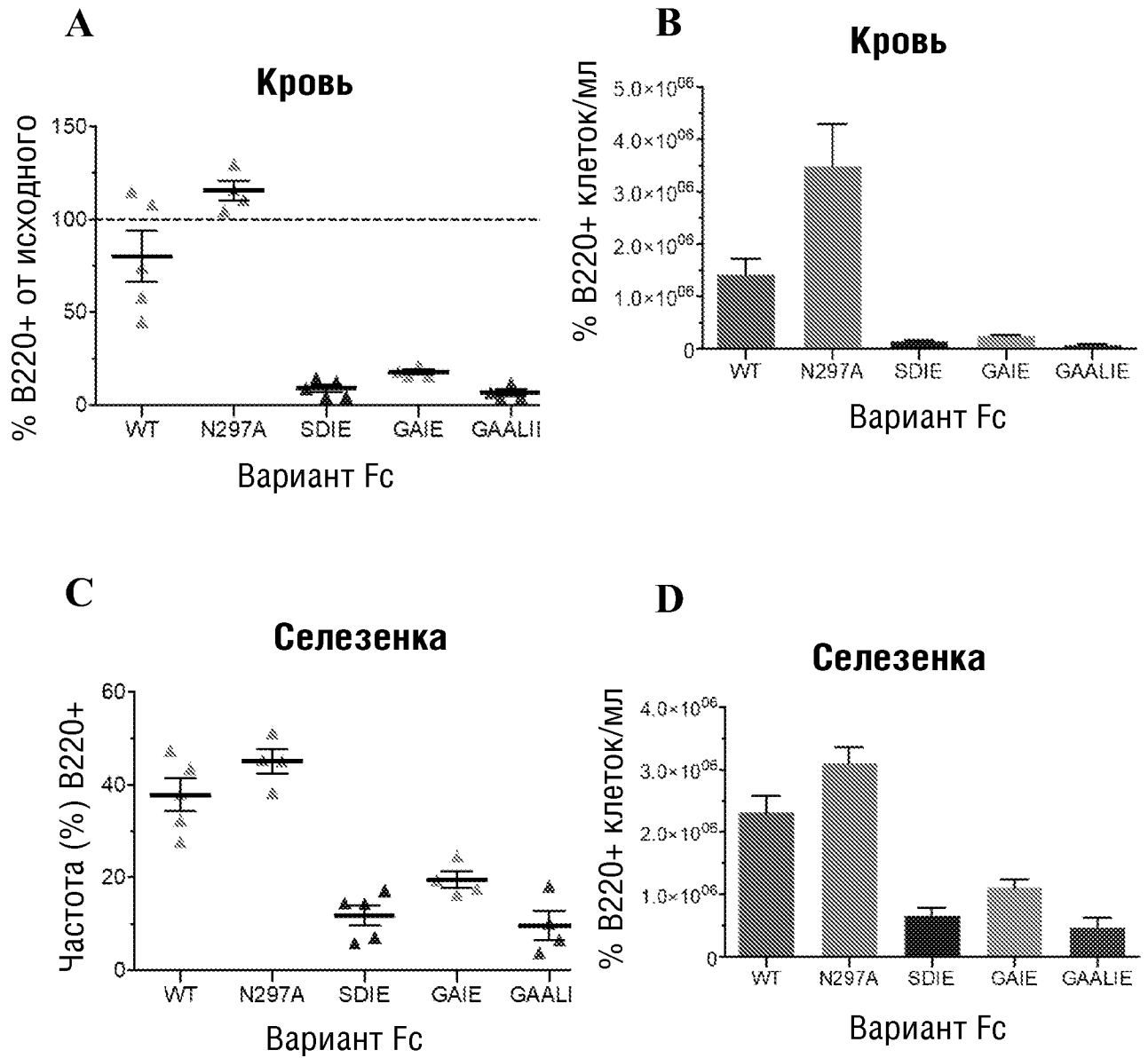
ФИГ.9



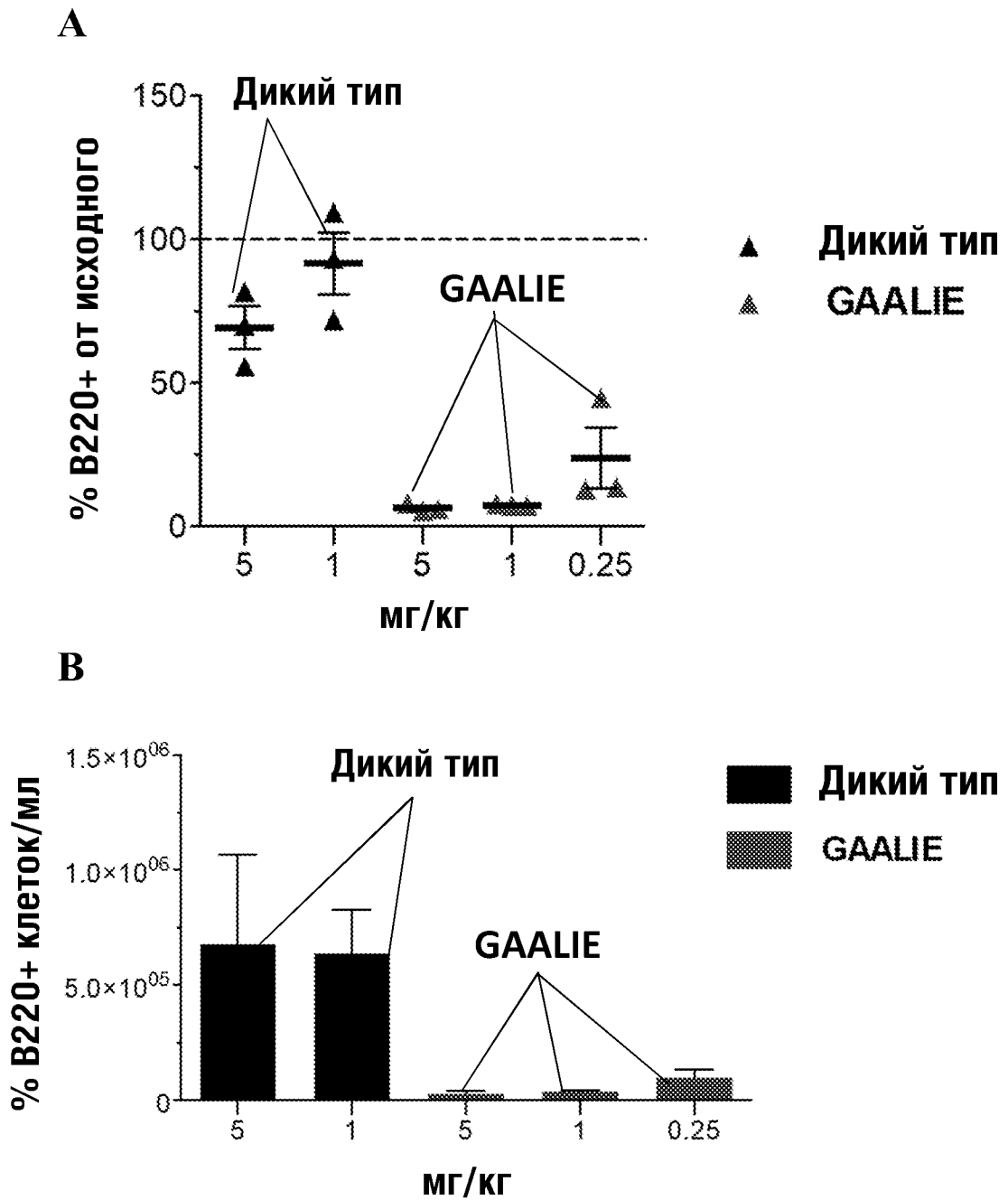
ФИГ.10А, 10В



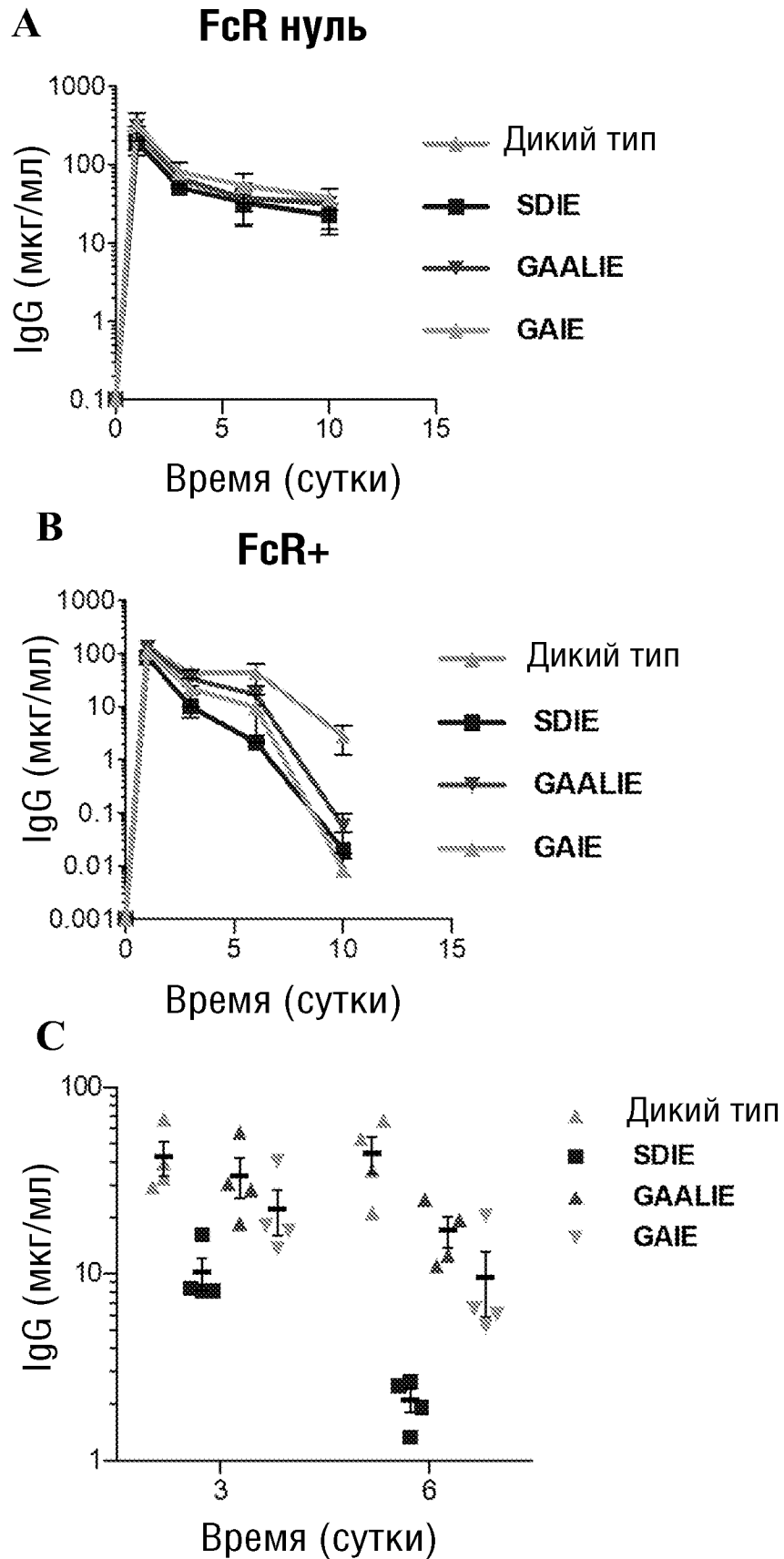
ФИГ.11А, 11В, 11С, 11D



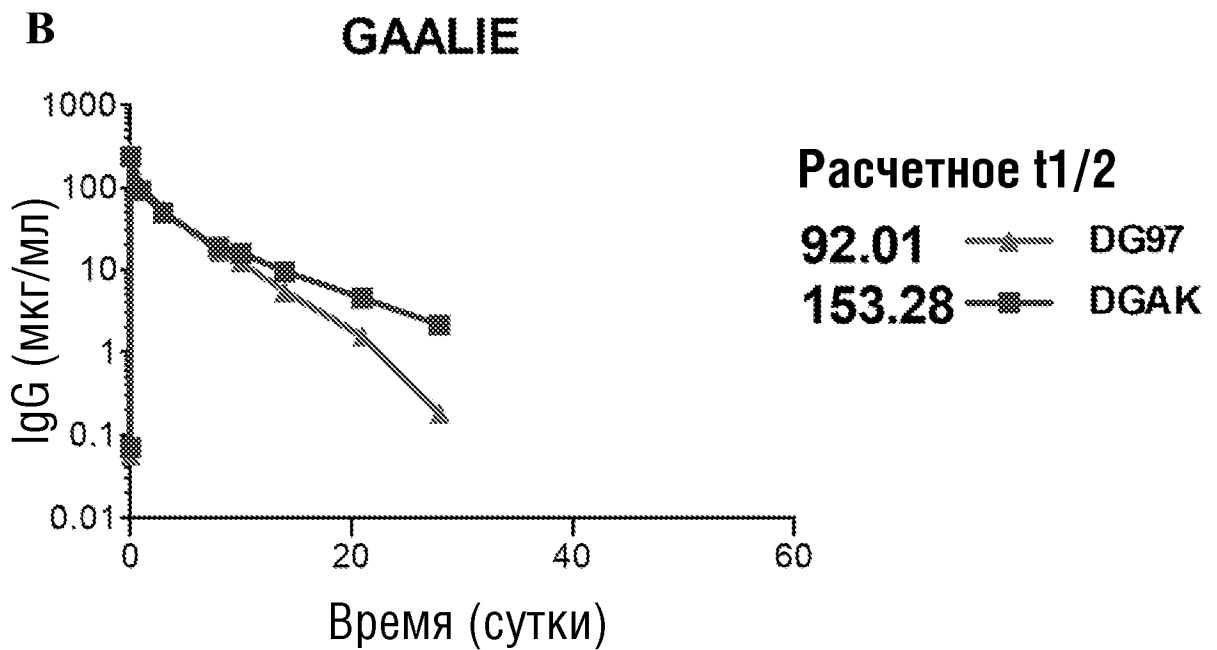
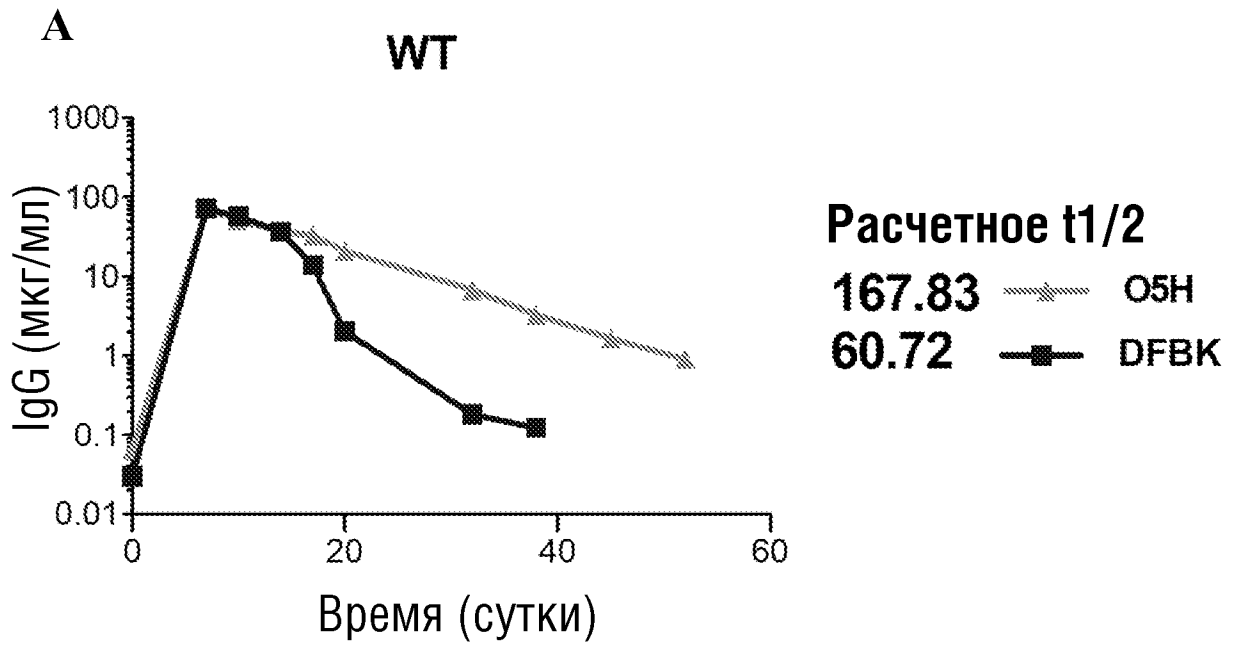
ФИГ.12А, 12В



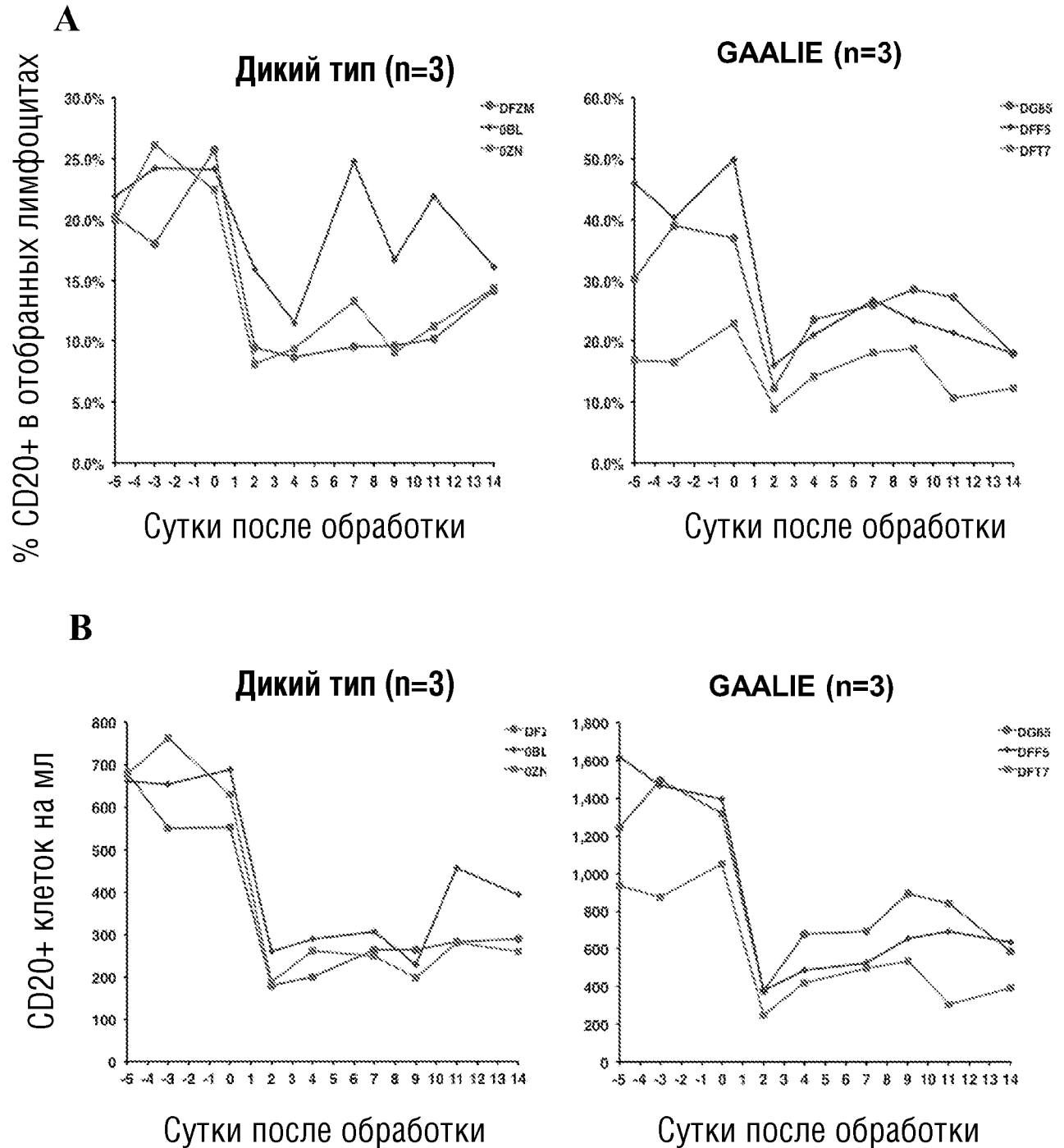
ФИГ.13А, 13В, 13С



ФИГ.14А, 14В



ФИГ.15А, 15В



ФИГ.16

Дикий тип (SEQ ID NO: 1)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
 VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKRV
 EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
 SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

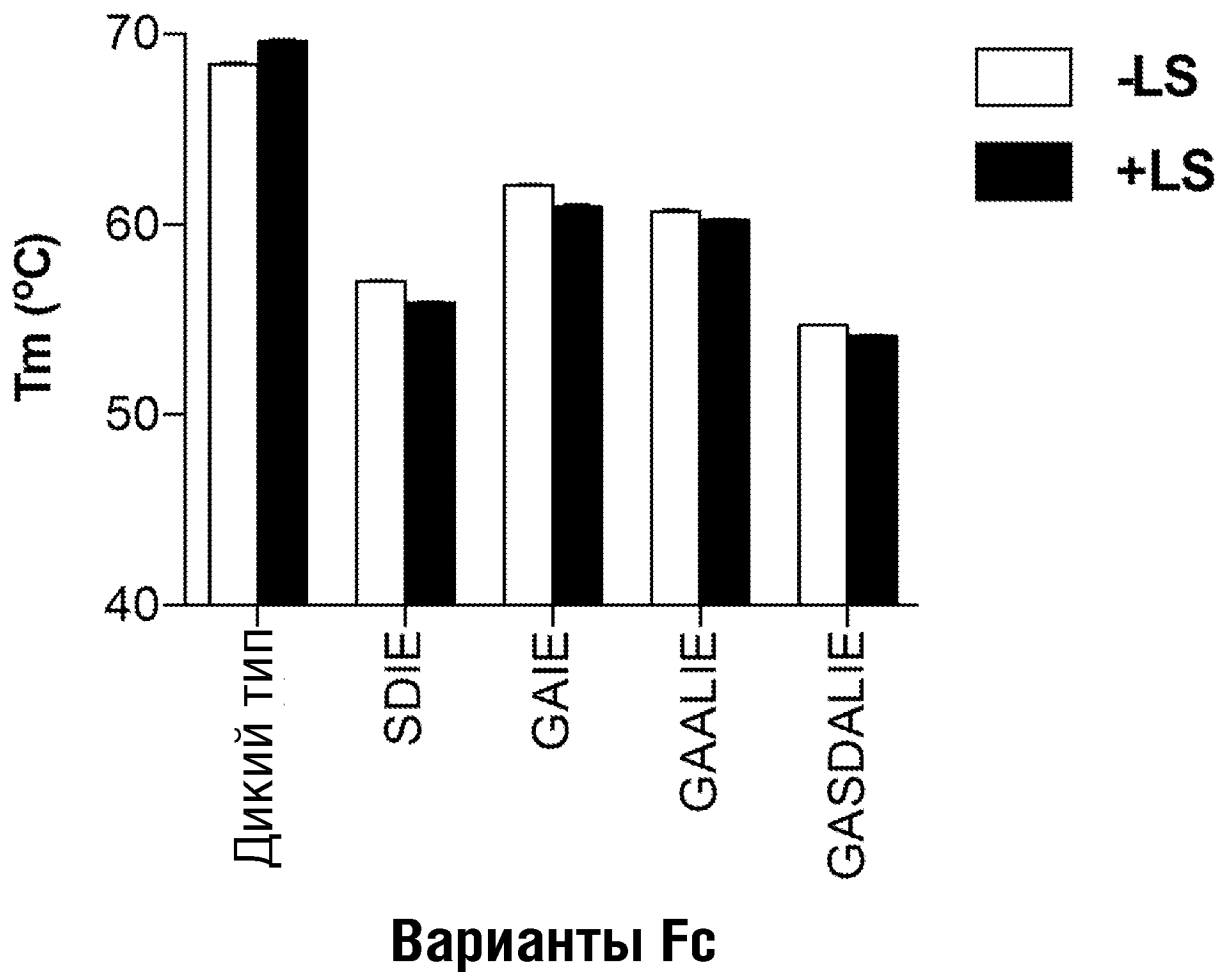
GAALIE (G236A/A330L/I332E) (SEQ ID NO: 2)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDK
 RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
 VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
 REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

GAALIE/LS (G236A/A330L/I332E/M428L/N434S) (SEQ ID NO: 3)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
 VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKRVE
 PKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKALPLPEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

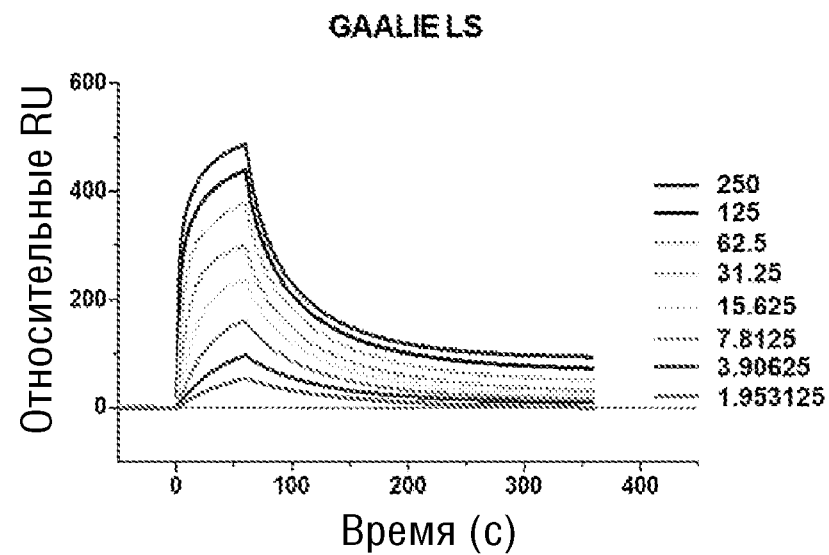
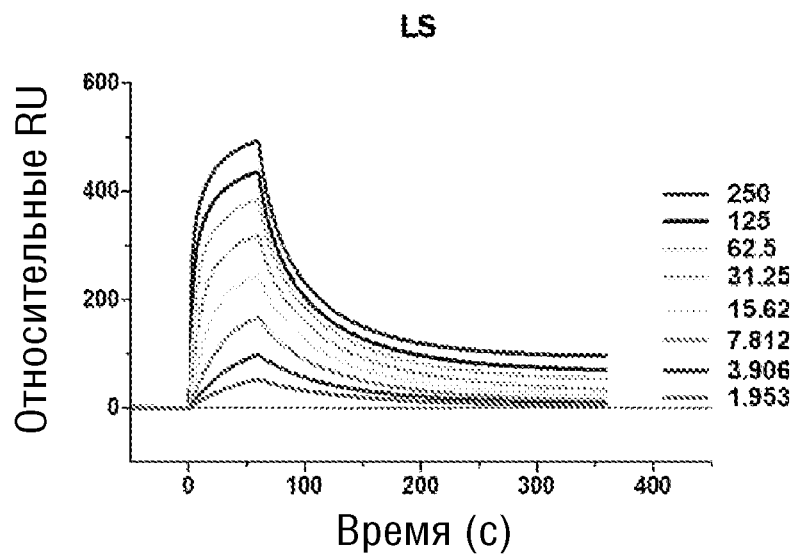
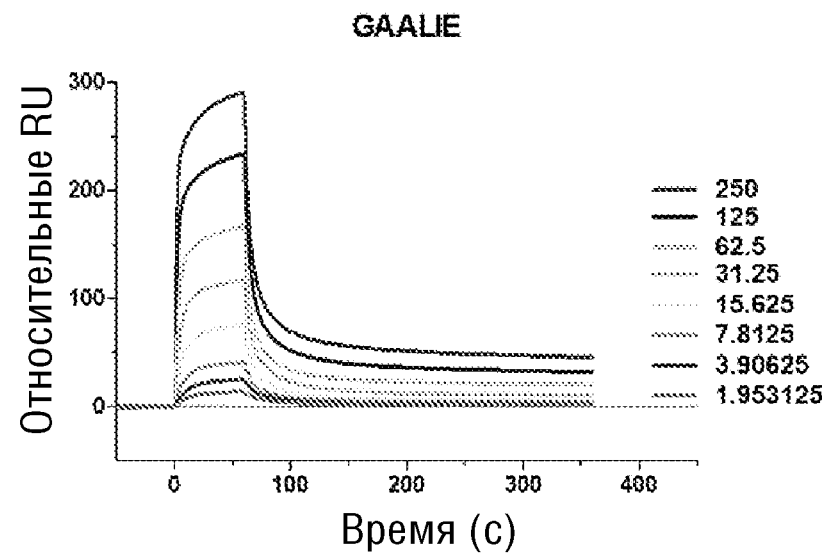
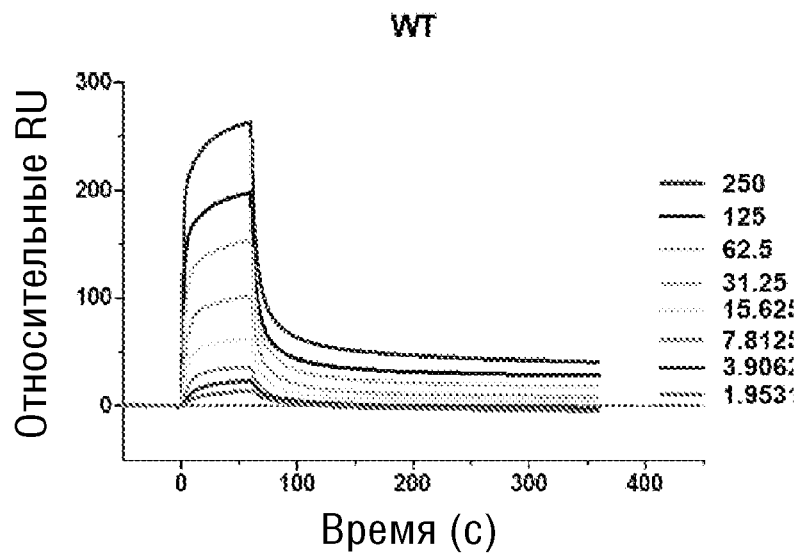
ФИГ.17



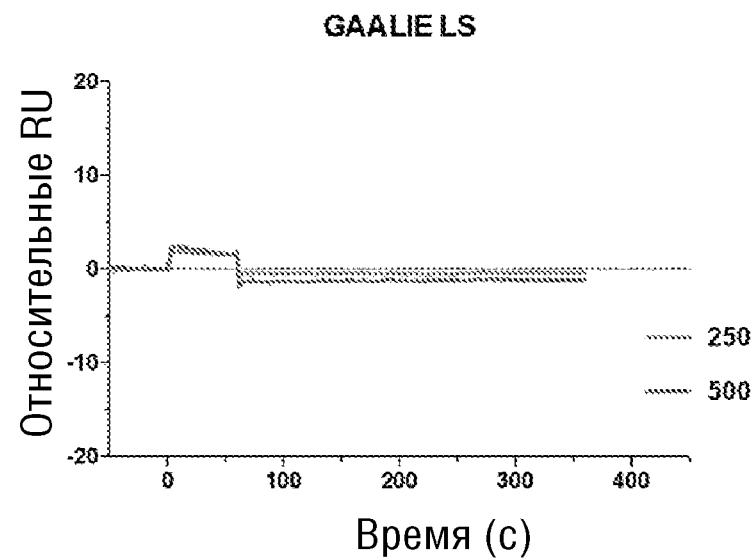
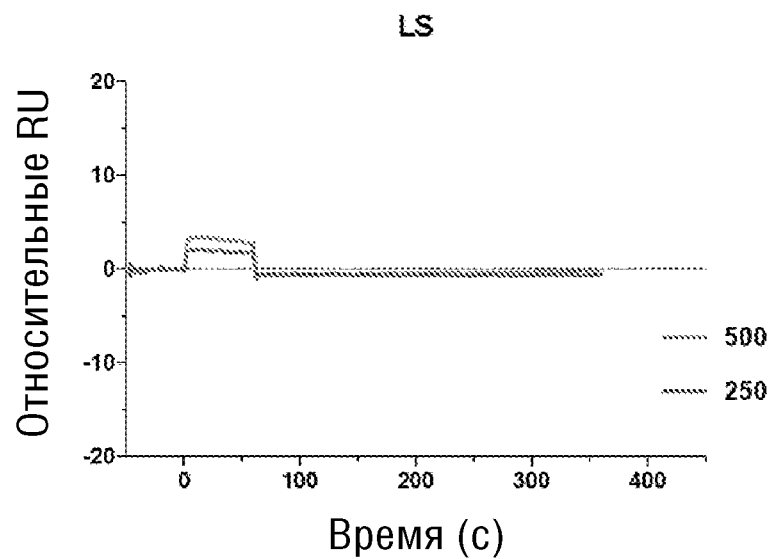
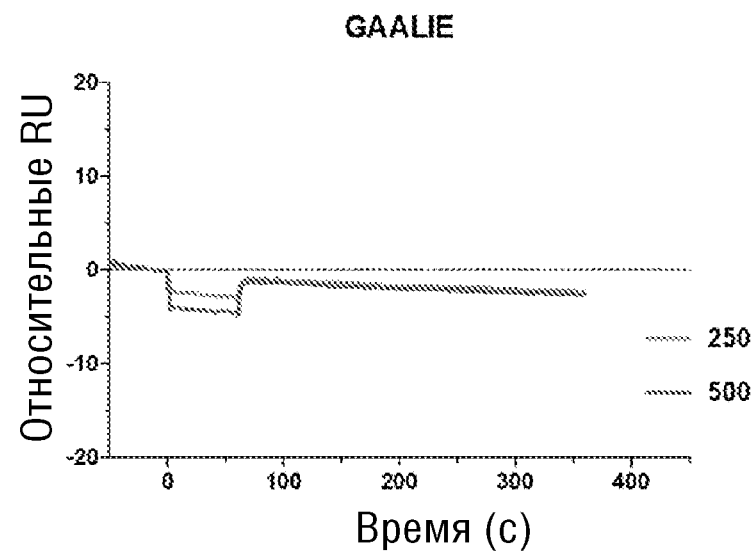
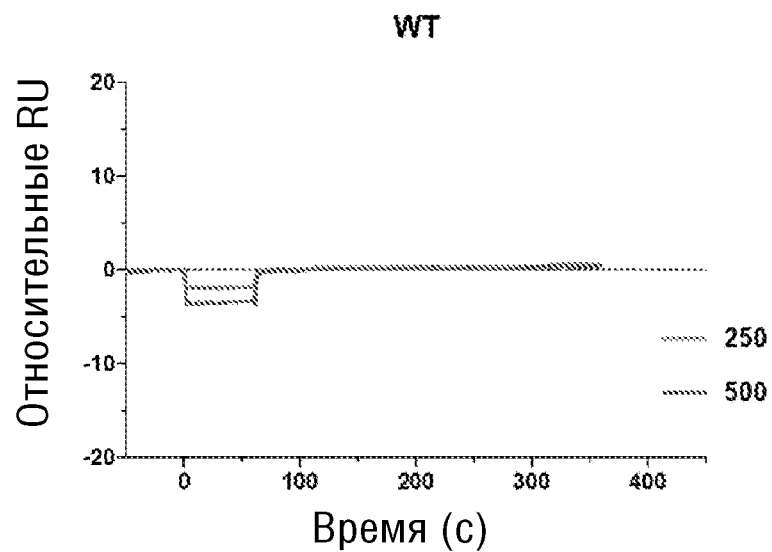
ФИГ.18

	LS-	LS+	Fold
Дикий тип	2.20×10^{-8}	1.66×10^{-9}	13.3
SDIE	1.27×10^{-8}	1.19×10^{-9}	10.7
GAIE	2.01×10^{-8}	1.99×10^{-9}	10.1
GAALIE	1.99×10^{-8}	1.40×10^{-9}	14.2

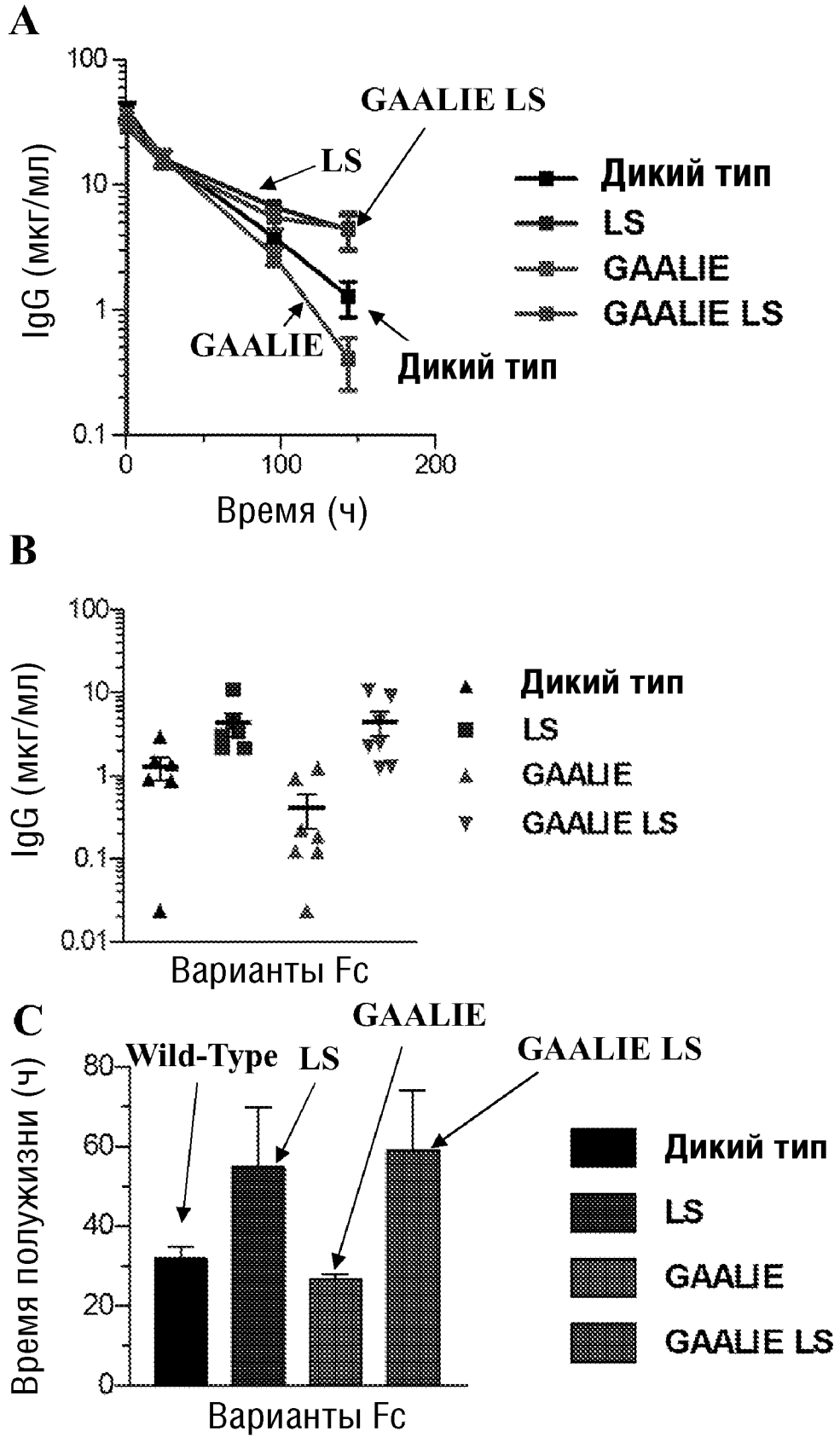
ФИГ.19



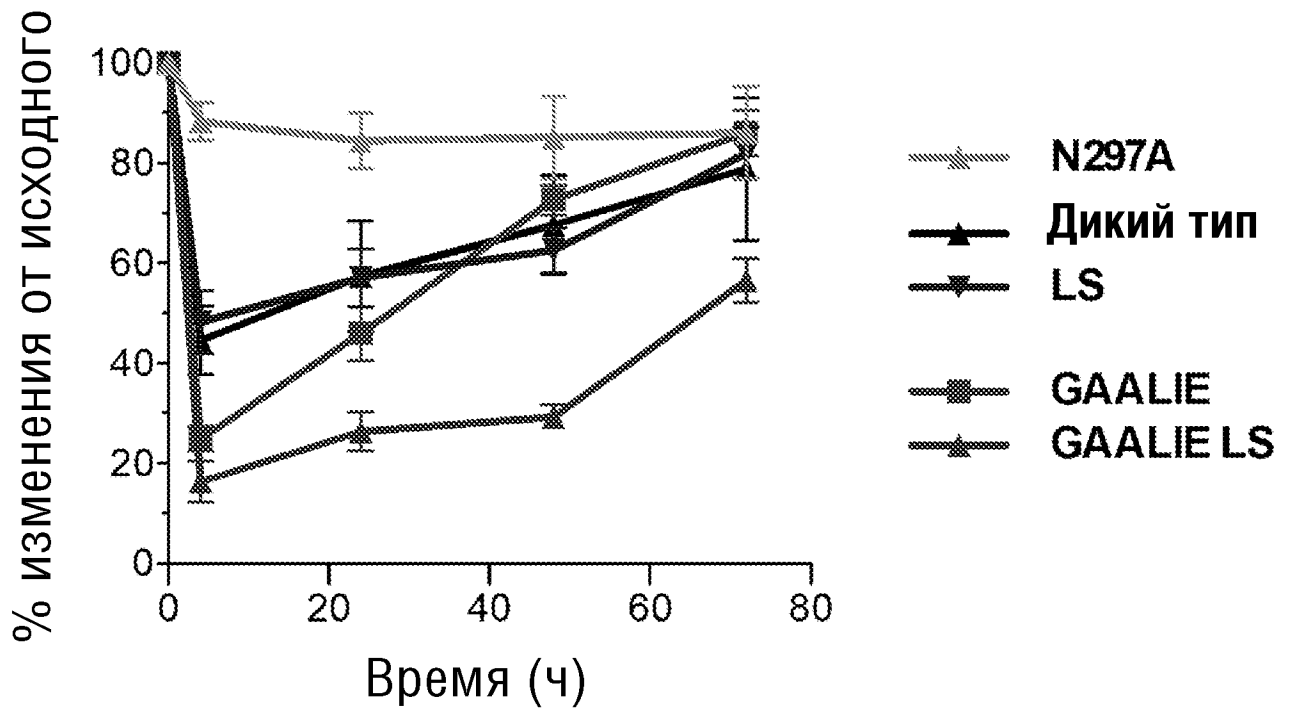
ФИГ.20



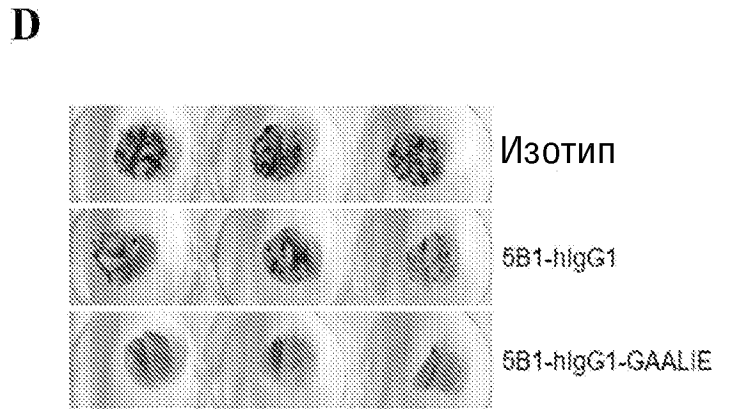
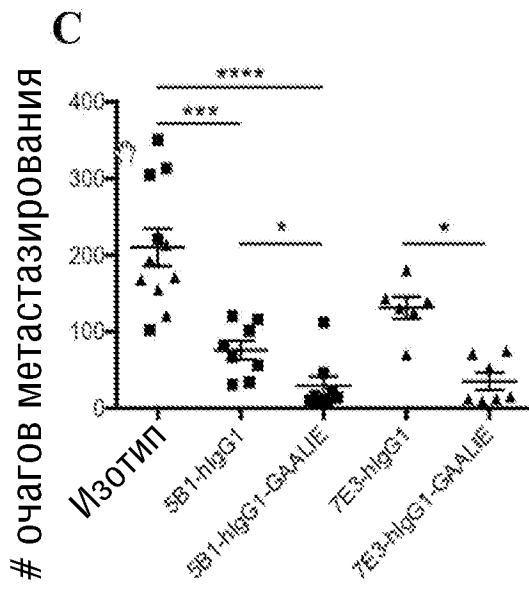
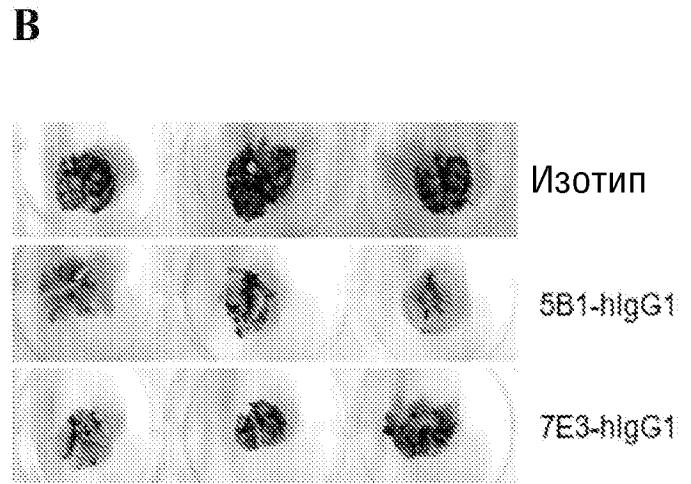
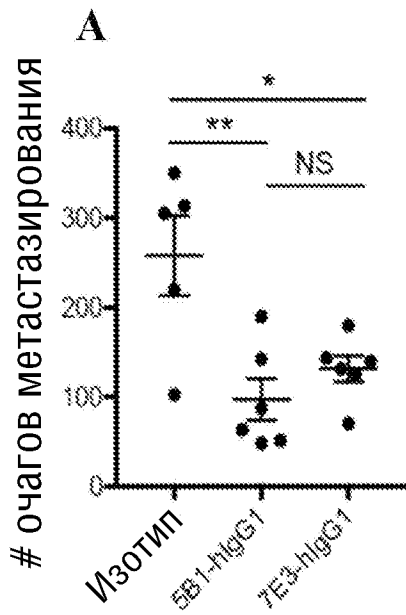
ФИГ.21А, 21В, 21С



ФИГ.22



ФИГ.23А, 23В, 23С, 23D

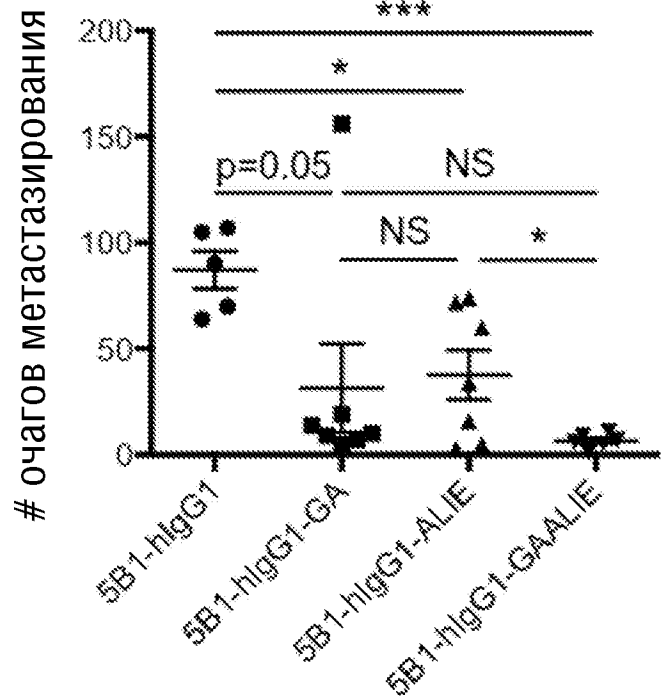


ФИГ.24А, 24В, 24С

А

Вариант Fc	hFcγRIIA	hFcγRIIIA
hIgG1 (WT)	+	+
GA	+++	+
ALIE	+	+++
GAALIE	+++	+++

В



С

