



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.03.26

(51) Int. Cl. C07K 16/10 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.05.23

(54) ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ

(31) 63/192,549; 63/265,032; 63/266,453

(32) 2021.05.24; 2021.12.06; 2022.01.05

(33) US

(86) PCT/US2022/030556

(87) WO 2022/251119 2022.12.01

(88) 2023.01.12

(71) Заявитель:

ВИР БАЙОТЕКНОЛОДЖИ, ИНК.  
(US); ХЬЮМАБС БАЙОМЕД СА  
(CH)

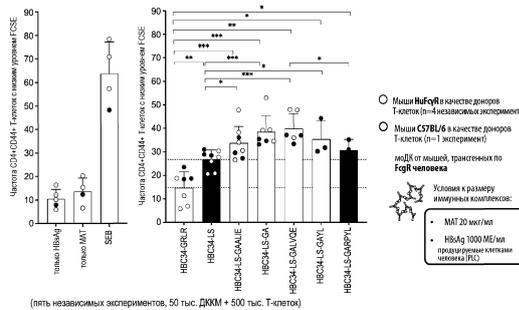
(72) Изобретатель:

Барта Иштван, Корти Давиде (CH),  
Чудноховски Надин (US), Шмид  
Михель Александер (CH), Снелл  
Дьёрдь, Теленти Амалио (US)

(74) Представитель:

Харин А.В., Стойко Г.В., Галухина  
Д.В., Буре Н.Н., Алексеев В.В. (RU)

(57) В данном документе предусматриваются генно-инженерные полипептиды (например, полипептиды Fc, фрагменты полипептида Fc, слитые белки Fc, антитела и т.п.), которые содержат вариант полипептида Fc IgG (или его часть или фрагмент), причем указанные варианты (и полипептиды, которые содержат такие варианты) имеют одну или несколько улучшенных характеристик по сравнению с известными полипептидами Fc.



## ГЕНО-ИНЖЕНЕРНЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ

### ЗАЯВЛЕНИЕ КАСАТЕЛЬНО ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Перечень последовательностей, связанный с данной заявкой, представлен в текстовом формате вместо бумажной копии, и настоящим включен в данное описание посредством ссылки. Текстовый файл, содержащий указанный перечень последовательностей, назван 930585\_422WO\_SEQUENCE\_LISTING.txt. Текстовый файл имеет размер 71,6 кб, был создан 20 мая 2022 г., и подан в электронном виде с помощью системы EFS-Web.

### ИЗВЕСТНЫЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

В настоящее время разрабатываются методы лечения с использованием антител и других молекул, включающих Fc-домены иммуноглобулинов. Fc могут взаимодействовать с белками иммунной системы, такими как FcγR и C1q комплемента, и характер таких взаимодействий может обеспечивать различные результаты, такие как, например, активация или подавление иммунного ответа хозяина против патогена.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ НЕСКОЛЬКИХ ВИДОВ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **Фиг. 1A-1E** показано, что антитела с определенными модификациями Fc обладают улучшенным профилактическим действием против гриппа А. На **Фиг. 1A** показан дизайн исследования, в котором мышам, модифицированным для экспрессии человеческих FcγR, внутривенно вводили антитела с вариантами Fc за два дня до инфицирования летальной интраназальной дозой H1N1 PR8. Уровни IgG в сыворотке оценивали в момент заражения (день 0), а массу тела и выживаемость мышей определяли в течение четырнадцати дней. **Фиг. 1B** показывает максимальное изменение массы тела мышей, получивших предварительно анти-FluA антитело IgG1 «F18», несущее мутации Fc G236A/A330L/I332E/M428L/N434S («F18-LS-GAALIE»), по сравнению с мышами, получившими предварительно антитело F18, несущее в Fc только мутации M428L/N434S («F18-LS»). Изменение массы тела (**Фиг. 1C**) и выживаемость (**Фиг. 1D**) оценивали также у мышей, получавших антитело, несущее мутации Fc G236A («GA»), A330L/I332E («ALIE»), G236A/A330L/I332E («GAALIE») или G237D/H268D/P271G/A330R («V11»). Мыши, которые получали антитело, несущее Fc дикого типа или афукозилированное Fc дикого типа, или получали ФСБ (фосфатно-солевой буфер), рассматривались как

контроли. Влияние мутации (мутаций) Fc на связывание антитела с Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa и Fc $\gamma$ RIIb, и на соотношение связывания с Fc $\gamma$ RIIa к Fc $\gamma$ RIIb, указано в пояснениях к Фиг. 1С. На Фиг. 1Е обобщены результаты связывания различных Fc $\gamma$ R указанными вариантами Fc.

На Фиг. 2 показаны предсказанные аффинности связывания определенных антител с вариантами Fc с Fc $\gamma$ RIIa (аллель R131) и Fc $\gamma$ RIIb.

Фиг. 3 показывает аффинность связывания Fc $\gamma$ R и C1q (измеренную методом анализа с помощью системы Meso Scale Discovery (MSD; с использованием электрохемилюминесценции)) и другие характеристики определенных антител с вариантами Fc IgG1. Варианты Fc, указанные начиная с третьего ряда и далее («G236A\_E272Y\_S298N» и ниже) были идентифицированы с помощью итеративного процесса обнаружения. Вариант G236A\_A330L\_I332E был использован в качестве сравнительного. Тестировали связывание антител с вариантами Fc с Fc $\gamma$ RIIa-H (высокоаффинный аллель H158), Fc $\gamma$ RIIb, Fc $\gamma$ RIIa-R (низкоаффинный аллель R131), Fc $\gamma$ RIIa-V (высокоаффинный аллель V158), Fc $\gamma$ RIIa-F (низкоаффинный аллель F158), Fc $\gamma$ RIIb и FcRn. Данные представлены в виде кратности изменений связывания по сравнению с IgG1 дикого типа. Также приведены соотношение связывания Fc $\gamma$ RIIa/Fc $\gamma$ RIIb, а также продуцируемый титр (мг/мл) и T<sub>m</sub> (°C) по сравнению с IgG1 дикого типа.

Фиг. 4А-4С показывают влияние фукозилирования на продукцию и очистку двадцати антител с вариантами Fc. Варианты экспрессировали в отсутствие («без 2FF») или в присутствии («+2FF») 2-дезоксигалактозаминазы (2FF); 2FF снижает фукозилирование. Фиг. 4А показывает титры антител, определенные с использованием колонки с белком А. Фиг. 4В показывает выходы, полученные при очистке в двух параллельных экспериментах. В таблице на Фиг. 4С обобщены теоретический максимальный выход и средний выход, оба измеренные в мкг, вместе с расчетным средним извлечением и концентрацией белка при втором элюировании (измеренной в мкг/мл). Варианты Fc были очищены с использованием двух элюций и объединены перед определением выхода.

На Фиг. 5 представлены результаты репрезентативных анализов очищенных антител с вариантами Fc методом абсолютной эксклюзионной хроматографии. Единичный пик слева был типичным для тестируемых вариантов, в то время как двойной

пик справа указывает на вариант, у которого наблюдались низкомолекулярные формы (LMWS).

На **Фиг. 6А и 6В** представлены кривые  $T_m$  антител с Fc дикого типа (6А) или вариантом Fc R292P (6В).

**Фиг. 7А и 7В** обобщают связывание с Fc $\gamma$ R и другие характеристики вариантов Fc, по сравнению с Fc дикого типа. Столбцы гистограмм и значения указывают кратность изменения связывания по сравнению с Fc дикого типа. Представленные варианты Fc не были обработаны 2FF. **Фиг. 7А** показывает связывание с Fc $\gamma$ RIIA-H (высокоаффинный), Fc $\gamma$ RIIA-R (низкоаффинный), Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIIA-V (высокоаффинный), Fc $\gamma$ RIIA-F (низкоаффинный) и FcRn (при pH 6). **Фиг. 7В** дополнительно показывает соотношение связывания Fc $\gamma$ RIIA-H/Fc $\gamma$ RIIB, а также связывание C1q и комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ), причем «базовое» значение ДТ (дикого типа) указано пунктирной вертикальной красной линией. Связывание измеряли путем анализа с помощью системы Meso Scale Discovery (MSD; с использованием электрохемилюминесценции).

**Фиг. 8** показывает связывание определенных вариантов Fc с Fc $\gamma$ RIIA-H (высокоаффинный) и Fc $\gamma$ RIIB. Значения, соединенные линиями, относятся к одному и тому же варианту. Представленные варианты не были обработаны 2FF.

**Фиг. 9А-9В** демонстрируют сигнализацию Fc $\gamma$ R через разные Fc $\gamma$ R, измеренную с использованием репортерного клеточного анализа (Promega; тестируемые клетки экспрессировали один тип/аллель Fc $\gamma$ R, как указано). Представленные варианты Fc являются фукозилированными («fuc»; 9А/9В) или афукозилированными («afuc»; 9В) как указано на фигуре. Значения рассчитаны по среднему для трех экспериментов и указывают кратность изменения (выраженного линейно) площади под кривой (в логарифмических координатах) по сравнению с Fc дикого типа.

**Фиг. 10А-1-10С** обобщают характеристики определенных вариантов Fc. Антитела, содержащие указанные Fc, были экспрессированы как рекомбинантный IgG1 человека. Представленные на **Фиг. 10В-1-10В-4** варианты являются афукозилированными. Связывание измеряли путем анализа с помощью системы Meso Scale Discovery (MSD; с использованием электрохемилюминесценции). Значения представляют кратность изменения по сравнению с антителом, содержащим фукозилированный Fc IgG1 человека дикого типа. **Фиг. 10А-3, 10А-4, 10В-3 и 10В-4** также показывают кратность изменения сигнализации Fc $\gamma$ R, измеренную с использованием репортерного клеточного анализа.

**Фиг. 11** показывает (слева) схематически анализ связывания с помощью системы Meso Scale Discovery для оценки связывания антитела с вариантом Fc с FcγR, и (справа) схематически клеточный репортерный анализ для измерения FcγR-опосредованной клеточной сигнализации, индуцируемой антителом с вариантом Fc.

**Фиг. 12А-12В** показывают сигнализацию FcγR через FcγR1А-Н (высокоаффинный, Фиг. 12А) и FcγR1В (Фиг. 12В) вариантом Fc «G236A\_R292P\_Y300L», измеренную с использованием репортерного клеточного анализа.

**Фиг. 13А-13В** показывают зависимость связывания FcγR вариантами Fc от сигнализации через FcγR1А-Н (высокоаффинный, Фиг. 13А) и FcγR1В (Фиг. 13В). Связывание FcγR измеряли путем анализа связывания с помощью системы Meso Scale Discovery и сигнализацию FcγR измеряли с использованием репортерного клеточного анализа (Promega).

**Фиг. 14А-14В** показывают активацию антителом FM08 против гемагглютинина (ГА) гриппа, содержащим вариант Fc, клеток Jurkat, экспрессирующих FcγR1А (H131) (**А**) или FcγR1В (F158) (**В**) человека, с клеточной линией A549-СА, стабильно экспрессирующей ГА гриппа СА-2009-Н1N1. **Фиг. 14С** показывает опосредованную естественными киллерными (ЕК) клетками антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦТ) антител против клеток-мишеней A549-СА, стабильно экспрессирующих ГА гриппа СА-2009-Н1N1, с использованием выделенных эффекторных ЕК-клеток (HM\_WB014\_FF) при соотношении Э:М = 6:1, в анализе высвобождения ЛДГ (лактатдегидрогеназы).

**Фиг. 15** обобщает результаты анализов связывания C1q с использованием указанных антител с вариантами Fc FY1 (против стебля гемагглютинина (“ГА”) гриппа; Kallewaard *et al. Cell* 166(3):596-608 (2016)). Анализ: Связывание Fc антитела (случайный захват на сенсоре Octet) с C1q человека в растворе.

**Фиг. 16А-16В** показывает активацию анти-НВsAg антителом НВС34v35, содержащим вариант Fc, клеток Jurkat, экспрессирующих FcγR1А (H131) (**А**) или FcγR1В (F158) (**В**) человека с клеточной линией-мишенью, стабильно экспрессирующей НВsAg.

**Фиг. 17А-17D** показывают результаты экспериментов, повторяющих представленные на Фиг. 16А и 16В.

На Фиг. 18-20 используются следующие акронимы для обозначения вариантов Fc: GA = G236A; GALVQE = G236A\_L328V\_Q295E; GAYL = G236A\_Y300L; GARPYL =

G236A\_R292P\_Y300L; и GARPIN = G236A\_R292P\_I377N; GAALIE = G236A\_A330L\_I332E; GRLR = G236R\_L328R.

**Фиг. 18** показывает результаты экспериментов по измерению: связывания FcγR; соотношения связывания аллелей FcγRIIA и FcγRIIB; связывания C1q; температуры плавления; и связывания FcRn, некоторыми антителами с вариантами Fc. Противогриппозное антитело FY1 экспрессировали как рекомбинантный IgG1m3 с мутациями M428L и N434S в CH3, и с указанными комбинированными мутациями в других частях Fc. Связывание (одно исследование) измеряли путем анализа с помощью системы Meso Scale Discovery (MSD; с использованием электрохемилюминесценции). Данные по связыванию приводятся как кратность изменения по сравнению с FY1 rIgG1m3-MLNS без других мутаций Fc. Связывание FcγR подтверждали FcγR-сигнализацией с использованием репортерного клеточного анализа (направляемая NFAT люцифераза) (Promega).

**Фиг. 19** показывает результаты дополнительных экспериментов по измерению характеристик антитела, как на Фиг. 18. В этих экспериментах FY1 экспрессировали как рекомбинантный IgG1m3 без мутаций M428L и N434S (*m.e.*, с CH1-CH3 IgG1m3 дикого типа или с мутациями, указанными в таблице). Антитела FY1-rIgG1m3 и FY1-rIgG1m3-GAALIE были продуцированы и измерены дважды независимо на первом планшете; приведены усредненные данные. Антитело FY1-rIgG1m3-GA было продуцировано 2 раза независимо на первом и втором планшетах. Для других вариантов проводилось одно измерение. Связывание измеряли путем анализа с помощью системы Meso Scale Discovery (MSD; с использованием электрохемилюминесценции). Данные по связыванию представлены как кратность изменения по сравнению с FY1 rIgG1m3 с Fc дикого типа. Связывание/активацию FcγR проводили с использованием репортерного клеточного анализа (направляемая NFAT люцифераза) (Promega).

**Фиг. 20** показывает результаты дополнительных экспериментов по измерению характеристик, как на Фиг. 19, с использованием афукозилированных антител с вариантами Fc. Антитела продуцировали в присутствии 2FF для получения афукозилированных гликанов. В этих экспериментах FY1 экспрессировали как рекомбинантный IgG1m3 без мутаций M428L и N434S (*m.e.*, с CH1-CH3 IgG1m3 дикого типа или с мутациями, указанными в таблице). Антитела FY1-rIgG1m3 и FY1-rIgG1m3-GAALIE были продуцированы и измерены дважды независимо на первом планшете; приведены усредненные данные. Антитело FY1-rIgG1m3-GA было продуцировано 2 раза

независимо на первом и втором планшетах. Для других вариантов проводилось одно измерение. Связывание измеряли путем анализа с помощью системы Meso Scale Discovery (MSD; с использованием электрохемилюминесценции).

**Фиг. 21** показывает активацию/сигнализацию Fc $\gamma$ RIIA противогриппозными антителами FY1 с вариантами Fc, как указано в пояснительных надписях. Клетками-мишенями были клетки A549, экспрессирующие ГА FluA H1N1, и репортерными клетками были клетки Jurkat, экспрессирующие Fc $\gamma$ RIIA (аллель H131) и люциферазу под контролем промотора NFAT.

**Фиг. 22А и 22В** показывают активацию/сигнализацию Fc $\gamma$ RIIA противогриппозными антителами FY1 с вариантами Fc, как указано в пояснительных надписях. Клетками-мишенями были клетки A549, экспрессирующие ГА FluA H1N1, и репортерными клетками были клетки Jurkat, экспрессирующие Fc $\gamma$ RIIA (аллель с пониженной аффинностью F158 (А) или аллель с более высокой аффинностью V158 (В)) и люциферазу под контролем промотора NFAT.

**Фиг. 23** изображает схему, иллюстрирующую анализ методом поверхностного плазмонного резонанса для измерения кинетики связывания вариантов Fc FY1 (экспрессирован как рекомбинантный rIgG1m3 с M428L и N434S и без других мутаций Fc, или с указанными дополнительными мутациями Fc) против Fc $\gamma$ R человека. Вкратце, для захвата биотинилированных Fc $\gamma$ R стрептавидином был использован чип САР. Варианты Fc FY1 вводили в концентрациях 819, 273, 91, 30,3 и 10,1 нМ. Введение проб производили последовательно без регенерации между разными концентрациями одного и того же образца. Ввод пробы: 600 секунд. Диссоциация 100 секунд для каждой вводимой пробы.

**Фиг. 24** представляет собой таблицу, показывающую кратность изменения результатов (по сравнению с референсным антителом FY1-rIgG1m3-LS) на основании данных связывания, полученных методом ППР. N=1. Кратность изменения рассчитывали путем деления значения аффинности, определенного для FY1-rIgG1m3-LS, на значение, определенное для варианта Fc. Большая кратность изменения соответствует снижению KD и увеличению аффинности. «-» = отсутствие измеримого связывания или слабое связывание.

**Фиг. 25А-25В** показывают активацию/сигнализацию Fc $\gamma$ R анти-SARS-CoV-2 антителом S309 с вариантом Fc, как указано в пояснительных надписях. Все антитела, за исключением отрицательного контроля «S309-GRLR» (включающего мутации Fc G236R и L328R), включали мутации Fc M428L и N434S. Активацию/сигнализацию измеряли с

использованием клеток CHO, экспрессирующих белок SARS-CoV-2 S и репортерных клеток люциферазы (Promega), экспрессирующих FcγRIIIA (A) или FcγRIIA (B). **Фиг. 25C** показывает опосредованную ЕК-клетками АЗКЦТ антител с вариантами Fc S309. Использовали донорные МНКПК (моноклеарные клетки периферической крови) и клетки S-CHO-HiBit, как указано. По точкам данных при концентрации антитела 10<sup>4</sup> нг/мл, кривые на **Фиг. 25A** расположены в следующем порядке, сверху вниз: S309-LS-afuc; S309-LS-GA-afuc; S309-LS-GAPAQE-afuc; S309-LS-GALVQE-afuc ~ S309-LS-GAALIE ~ S309-LS-GARPYL; S309-LS; S309-LS-GAYL; S309-LS-GA; S309-LS-GAPAQE ~ S309-LS-GALVQE ~ S309-GRLR. При концентрации антитела 10<sup>4</sup> нг/мл, на **Фиг. 25B** нижней кривой является S309-GRLR, второй снизу кривой является S309-LS, и третьей снизу кривой является S309-LS-GAALIE. На **Фиг. 25C**, некоторые варианты Fc (S309-LS-afuc; S309-LS-GA-afuc; S309-LS-GARPYL; S309-LS-GALVQE-afuc; S309-LS-GAALIE) не титруются на АЗКЦТ, поскольку достигнутый сигнал приближался к максимуму/плато анализа. Для других вариантов Fc, порядок убывания был следующим: S309-LS-GAPAQE-afuc > S309-LS > S309-LS-GA > S309-LS-GAYL > S309-LS-GALVQE > S309-LS-GAPAQE > S309-GRLR.

**Фиг. 26A-26F** показывают сигнализацию FcγR (A-D) и опосредованный ЕК-клетками киллинг (E-F), индуцируемые посредством вариантов Fc S309. (A) и (B) показывают активацию/сигнализацию FcγRIIA с использованием репортерных клеток Jurkat (Promega), экспрессирующих FcγRIIA (аллель H131), направляющий экспрессию люциферазы и, в качестве клеток-мишеней, CHO, экспрессирующие спайковый белок SARS-CoV-2. (A) = фукозилированные антитела, (B) = афукозилированные антитела. (C) и (D) показывают активацию/сигнализацию FcγRIIA с использованием репортерных клеток Jurkat (Promega), экспрессирующих FcγRIIA (аллель V158), направляющий экспрессию люциферазы и, в качестве клеток-мишеней, CHO, экспрессирующие спайковый белок SARS-CoV-2. (C) = фукозилированные антитела, (D) = афукозилированные антитела, за исключением образцов сравнения S309-LS и S309-GRLR. (E) и (F) показывают опосредованную ЕК-клетками АЗКЦТ. Были использованы донорные клетки МНКПК/ЕК, экспрессирующие FcγRIIA (гетерозиготные V158/F158) и, в качестве клеток-мишеней, CHO, экспрессирующие спайковый белок SARS-CoV-2. (E) = фукозилированные антитела, (F) = афукозилированные антитела, за исключением образцов сравнения S309-LS и S309-GRLR. Некоторые варианты Fc не титруются на АЗКЦТ, поскольку достигнутый сигнал приближается к максимуму/плато анализа. На **Фиг. 26E**, нижняя

кривая соответствует S309-GRLR. На Фиг. 26F, кривая со второй снизу точки данных при  $10^4$  нг/мл антитела соответствует S309-LS.

**Фиг. 27A-27J** относятся к определенным анти-SARS-CoV-2 антителам, содержащим варианты Fc. (A)-(C): активация/сигнализация Fc $\gamma$ RIIIA, определяемая по люминесценции через 23 ч с использованием репортерных клеток, экспрессирующих Fc $\gamma$ RIIIA человека, направляющий экспрессию люциферазы и, в качестве клеток-мишеней, Ecr1CHO, трансфицированные спайковым белком SARS-CoV-2, как указано; на (A), верхняя кривая соответствует S309; на (B) был использован стабилизированный мутацией спайковый белок Wuhan-Hu-1, в котором шеддинг белка S из клетки-мишени невозможен. (D)-(F): активация/сигнализация Fc $\gamma$ RIIA, определяемая по люминесценции через 23 ч с использованием репортерных клеток, экспрессирующих Fc $\gamma$ RIIA человека, направляющий экспрессию люциферазы и, в качестве клеток-мишеней, Ecr1CHO, трансфицированные спайковым белком SARS-CoV-2, как указано. (G)-(H): опосредованная ЕК-клетками АЗКЦТ (2 донорных ЕК-клетки, одна из которых экспрессирует F158/V158 Fc $\gamma$ RIIA (G), и другая экспрессирует V158/V158 (H)), с использованием клеток S-CHO-HiBiT (экспрессирующих спайковую последовательность Wuhan-Hu-1 SARS-CoV-2 дикого типа) в качестве клеток-мишеней, как указано. (I)-(J) моноцит-опосредованный АЗКФ (антителозависимый клеточный фагоцитоз) (2 донорных моноцита, один экспрессирующий R131/H131 Fc $\gamma$ RIIa и F158/F158 Fc $\gamma$ RIIA (I), и другой экспрессирующий R131/H131 Fc $\gamma$ RIIa и F158/V158 Fc $\gamma$ RIIA (J)) с использованием клеток CHO, экспрессирующих спайковый белок Wuhan SARS-CoV-2, как указано. Пунктирные горизонтальные линии внизу каждого графика указывают значение лизиса для клеток-мишеней + эффекторные клетки без антитела. На Фиг. 27B при концентрации антитела  $10^4$  нг/мл, кривые соответствуют, сверху вниз: S2X259-LS-GA-afuc; S2X259-v5 GAALIE; S2X259-LS-GARPYL; S309; S2X259-LS; S2X259-LS-GA; S2X259-LS-GALVQE ~S2X259-LS-GALVQE-afuc ~S309-GRLR ~S2X259-GRLR. На Фиг. 27C при концентрации антитела  $10^4$  нг/мл, кривые соответствуют, сверху вниз: S309; S2X259-LS-GALVQE-afuc; S2X259-LS-GRLR; S2X259-LS-GARPYL; S2X259-LS-GA; S2X259-v5-GAALIE; S2X259-LS; S2X259-LS-GALVQE; S309-GRLR. На Фиг. 27E при концентрации антитела  $10^4$  нг/мл, верхние пять кривых соответствуют, сверху вниз: S2X259-LS-GALVQE; S2X259-LS-GA; S2X259-LS-GARPYL; S2X259-v5-GAALIE; S2X259-LS-GA-afuc. На Фиг. 27G при концентрации антитела  $10^4$  нг/мл, кривые соответствуют, сверху вниз: S2X259.1-LS-GARPYL; S2X259.1-LS-GALVQE-afuc; S2X259.1-LS-GA-afuc; S2X259-GAALIE;

S2X259.1-LS; S2X259.1-LS-GA; S2X259.1-LS-GALVQE; S2X259.1-LS-GRLR. На Фиг. 27H при концентрации антитела  $10^4$  нг/мл, кривые соответствуют, сверху вниз: S2X259.1-LS-GARPYL; S2X259.1-LS-GALVQE-afuc; S2X259.1-LS-GA-afuc; S2X259.1-LS; S2X259-GAALIE; S2X259.1-LS-GA; S2X259.1-LS-GRLR; S2X259.1-LS-GALVQE. На Фиг. 27I при концентрации антитела  $10^4$  нг/мл, верхняя кривая соответствует S309-DEA и нижняя кривая соответствует S2X259.1-LS-GRLR. На Фиг. 27J при концентрации антитела  $10^4$  нг/мл, верхняя кривая соответствует S2X259-GAALIE и нижняя кривая соответствует S2X259.1-LS-GRLR.

**Фиг. 28А-28D** относятся к определенным анти-SARS-CoV-2 антителам, содержащим варианты Fc. (А)-(В) Активация/сигнализация FcγRIIIА, определяемая по люминесценции с использованием репортерных клеток, экспрессирующих FcγRIIIА человека, направляющий экспрессию люциферазы (Promega) и, в качестве клеток-мишеней, Ехр1СНО, трансфицированных спайковым белком SARS-CoV-2. (А) спайковый белок Wuhan-Hu-1; (В) стабилизированный мутацией спайковый белок Wuhan-Hu-1, в котором шеддинг белка S из клетки-мишени невозможен. (С)-(D) Опосредованная ЕК-клетками антитело-зависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦТ). Донорные МНКПК/первичные ЕК-клетки, экспрессирующие F158/V158 (С) или V158/V158 (D) FcγRIIIА. Некоторые варианты Fc не титруются, поскольку сигнал близок к максимуму/плато анализа.

**Фиг. 29А-29Q** относятся к определенным анти-HBV («НВС34-v40») антителам вариантов Fc. (А)-(В) Клетки CD83+ в *ex vivo* HBV+ сыворотке пациента (определяемые методом проточной цитометрии) с антителом НВС34-v40 с вариантом Fc, и HBsAg, как указано. На (В), для каждого из условий (30 HBsAg МО/мл, 100 HBsAg МО/мл, 300 HBsAg МО/мл, 1000 HBsAg МО/мл) представлены четыре кластера вертикально разбросанных точек данных. Для каждого значения концентрации HBsAg: крайний левый кластер соответствует НВС34-v40-rIgG1-GRLR; второй слева кластер соответствует НВС34-v40-rIgG1-LS; второй справа кластер соответствует НВС34-v40-rIgG1-LS-GAALIE; и крайний правый кластер соответствует НВС34-v40-rIgG1-LS-GA. (С) Схематическое изображение дизайна 96-луночного 10-спотового планшета MSD MULTI-SPOT® для измерения продуцирования цитокинов. (D) Продуцирование цитокинов дендритными клетками, являющимися производными донорных моноцитов (моДК, 3 донора) против HBV+ сыворотки (5 доноров) и указанного антитела с вариантом Fc. Вертикально разбросанные точки данных сгруппированы в кластеры следующим образом

для каждого из значений концентрации HBsAg: крайний левый кластер = HBC34-v40-GRLR; второй слева кластер = HBC34-v40-rIgG1-LS; второй справа кластер = HBC34-v40-rIgG1-LS-GAALIE; правый кластер = HBC34-v40rIgG1-LS-GA. (E) Проточная цитометрия, показывающая экспрессию CD83 на моДК (экспрессирующих указанный Fc $\gamma$ R) в присутствии указанного антитела с вариантом Fc HBC34-v40 (50 мкг/мл) и 30 МО/мл HBsAg из сыворотки пациента HBV<sup>+</sup>. (F) Проточная цитометрия, показывающая экспрессию CD83 на моДК в присутствии антитела с вариантом Fc HBC34-v40 (50 мкг/мл) и HBsAg из сыворотки пациента HBV<sup>+</sup> (BioIVT) в указанной концентрации. Левые графики относятся к эксперименту с использованием первого метода пипетирования/получения иммунных комплексов антитело:HBsAg; правые графики относятся к эксперименту с использованием второго метода пипетирования/получения иммунных комплексов антитело:HBsAg. (G) Экспрессия CD25 (маркер активации) и CFSE (пролиферация) на аутологичных CD4<sup>+</sup> Т-клетках памяти (от особы, вакцинированной HBV), инкубируемых в течение 5 дней с моДК от того же донора; моДК сначала активировали в течение ночи со 100 МО/мл HBsAg (из сывороток двух пациентов) и 50 мкг/мл антитела с вариантом Fc HBC34-v40. Сравнение с вариантом LS-GAYL проводилось в одном эксперименте. (H) % CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти человека с низким содержанием CFSE, полученных от особ, вакцинированных против HBV антителами с указанными вариантами Fc, и сыворотками HBV<sup>+</sup> пациентов. Вертикально разбросанные точки данных сгруппированы в кластеры следующим образом на крайнем левом графике: крайний левый кластер = HBC34-v40-GRLR; второй слева кластер = HBC34-v40-rIgG1-LS; второй справа кластер = HBC34-v40-rIgG1-LS-GAALIE; правый кластер = HBC34-v40rIgG1-LS-GA. Такая же кластеризация на центральном и правом графиках, с добавлением HBC34-v40-rIgG1m3-LS-GAYL как крайнего правого кластера. (I)-(J) CD14<sup>+</sup> моноциты стимулировали IL-4 и ГМ-КСФ в течение 6 дней. моДК обрабатывали антигеном и антителом с вариантом Fc HBC34-v40 (50 мкг/мл) в течение ночи, затем культивировали совместно с сингенными по HLA-антигенам (HLA-DR-ограниченные) трансгенными клетками Jurkat, экспрессирующими HBsAg-специфический TCR человека. В качестве репортера GFP-NFAT использовали клетки Jurkat. (K) Сравнение репортерного анализа TCR Jurkat для трех независимых повторов эксперимента с 0,125 мкг/мл антитела. (L) Обобщенные данные различных анализов. (M) Схема, показывающая дизайн эксперимента для оценки *ex vivo* пролиферации Т-клеток мышей, экспрессирующих Fc $\gamma$ R, иммунизированных и получивших бустерную дозу

HBsAg-вакцины; CD44+ CD4+ Т-клетки памяти сортировали, метили CFSE, культивировали совместно с обработанными в импульсном режиме иммунным комплексом (антитело:антиген HBsAg) ДККМ (дендритными клетками костного мозга), и оценивали пролиферацию в день 6. SEB = стафилококковый энтеротоксин В *S. aureus*/ (N) Экспрессия CD4 и окрашивание CFSE (500000) CD4+ Т-клеток памяти, как в (M), причем ДККМ (50000) стимулировали с использованием иммунных комплексов, содержащих указанное антитело с вариантом Fc HBC34-v40 (20 мкг/мл) и HBsAg (1000 МО/мл). SEB = 1 мкг/мл; критерий Манна-Уитни. (N) (Слева) Частота CD4+ CD44+ Т-клеток с низким содержанием CFSE после инкубации с моДК, предварительно обработанными одним HBsAg, одним антителом, или SEB; (Справа) Частота CD4+ CD44+ Т-клеток с низким содержанием CFSE после инкубации с моДК, предварительно обработанными HBsAg и указанным антителом с вариантом Fc HBC34-v40 в указанной концентрации. моДК были взяты от мышей, трансгенно экспрессирующих FcγR человека, а Т-клетки принадлежали мышам HuFcγR (n=4 независимых эксперимента) или мышам C57Bl/6 (n=1 эксперимент). Для тестирования использовали 50000 моДК + 500000 Т-клеток. SEB = 1 мкг/мл; критерий Манна-Уитни. (P) Слева, схематическое изображение дизайна ППР-анализа для изучения связывания вариантов Fc HBC34-v40 с FcγR (чип CAP был использован для захвата биотинилированных белков FcγR стрептавидином; варианты Fc HBC34-v40-rIgG1m3 вводили в концентрациях 819, 273, 91, 30,3 и 10,1 нМ; введение осуществлялось последовательно без регенерации между разными концентрациями одного и того же образца; введение: 600 секунд; диссоциация 100 секунд для каждого введения), справа примеры кривых ППР, показывающих связывание с FcγR1IIA. (Q) Кратность изменения результатов для антител с вариантами Fc, рассчитанная путем деления соответствующего значения для контроля (HBC34-v40 rIgG1m3-LS) на значение, определенное для каждого варианта. Связывание измеряли путем анализа с помощью системы Meso Scale Discovery (MSD; с использованием электрохемилюминесценции). Больше значение отображает снижение величины KD и увеличение аффинности связывания. «-» = отсутствие связывания.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе предусматриваются генно-инженерные полипептиды (например, полипептиды Fc, фрагменты полипептидов Fc, слитые белки Fc, антитела и т.п.), содержащие вариант полипептида Fc IgG (или его часть или фрагмент), причем

указанные варианты (и полипептиды, содержащие такие варианты) обладают одной или несколькими улучшенными характеристиками по сравнению с известными полипептидами Fc (такими как, например, референсный полипептид Fc дикого типа и/или известный вариант полипептида Fc) или полипептидами, содержащими известный полипептид Fc. Раскрытые в данном документе полипептиды обладают, например: повышенным связыванием с одним или несколькими FcγRA человека (например, FcγR1A и/или FcγR1B; пониженным/уменьшенным связыванием с FcγR1B человека; повышенным связыванием с одним или несколькими FcγRA человека по сравнению с связыванием с FcγR1B человека; повышенной термостабильностью по сравнению с известными полипептидами Fc; повышенным связыванием с C1q человека; повышенной сигнализацией FcγR1A человека в клетке-хозяине, экспрессирующей FcγR1A, повышенной сигнализацией FcγR1A человека в клетке-хозяине, экспрессирующей FcγR1A, пониженной сигнализацией FcγR1B человека в клетке-хозяине, экспрессирующей FcγR1B, относительным увеличением связывания с FcγRA по сравнению с FcγR1B, улучшенные производственные характеристики по сравнению с известными полипептидами Fc; и комбинациями таких признаков.

В определенных вариантах осуществления, антитела, содержащие вариант полипептида Fc по настоящему изобретению, обеспечивают неожиданные преимущества, такие как любое одно или несколько из следующих: повышенная аффинность связывания (например, при определении методом поверхностного плазмонного резонанса, например, *с использованием* инструмента Biacore и/или при определении методом электрохемилюминесцентного анализа, таким как анализ с помощью системы Meso Scale Discovery (MSD)) по отношению к и/или индуцирование повышенной сигнализации (например, при определении с использованием (1) антитела с вариантом Fc (2) антиген-экспрессирующих клеток-мишеней и (3) репортерных клеток, экспрессирующих один или несколько FcγRA человека, необязательно направляющих экспрессию репортерного гена, такого как, например, GFP (зеленый флуоресцентный белок) или люцифераза) одного или нескольких FcγRA человека, по сравнению с антителом, содержащим референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования; пониженная аффинность связывания по отношению к и/или индуцирование пониженной сигнализации FcγR1B человека, по сравнению с антителом, содержащим референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования; уникальный и необязательно улучшенный профиль связывания в группе FcγR1A-H

человека, Fc $\gamma$ RIIA-R человека, Fc $\gamma$ RPIB человека, Fc $\gamma$ RPIIA-F человека и Fc $\gamma$ RPIIA-V человека, причем улучшенное связывание включает общее увеличение связывания с и/или активацию сигнализации Fc $\gamma$ RA по сравнению со связыванием с и/или активацией ингибирующей сигнализации Fc $\gamma$ R, по сравнению с антителом, содержащим референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования; повышенная аффинность связывания по отношению к C1q человека, по сравнению с антителом, содержащим референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования; отсутствие нежелательного эффекта или отсутствие существенного нежелательного эффекта на термическую стабильность, пониженный негативный эффект на термическую стабильность по сравнению с полипептидом варианта Fc или его фрагментом, не содержащим мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования (например, Fc IgG1 человека, содержащий мутации G236A, A330L и I332E (например, имеющий меньший эффект снижения, или отсутствие эффекта снижения температуры плавления по сравнению с антителом, содержащим Fc IgG1 человека, содержащим мутации G236A, A330L и I332E), или имеющий более высокую температуру плавления, чем антитело, содержащее Fc IgG1 человека, содержащий мутации G236A, A330L и I332E)); увеличение специфического лизиса (например, посредством АЗКЦТ) естественными киллерными клетками и/или МНКПК (например, экспрессирующими F158/V158 или V158/V158 Fc $\gamma$ RPIIA) против антиген-экспрессирующих клеток-мишеней, по сравнению с антителом, содержащим референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования (например, антитело, содержащее Fc IgG1 человека, содержащий мутации G236A, A330L и I332E); увеличение АЗКФ моноцитами (например, CD14<sup>+</sup> моноцитами, необязательно экспрессирующими F158/V158 Fc $\gamma$ RPIA и R131/H131 Fc $\gamma$ RPIA или F158/F158 Fc $\gamma$ RPIA и R131/H131 Fc $\gamma$ RPIA) против антиген-экспрессирующих клеток-мишеней, по сравнению с антителом, содержащим референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования; увеличение процента CD83<sup>+</sup> клеток (например, моДК) и/или увеличение экспрессии CD83 из моДК в образце при введении в комбинации с антигеном, по сравнению с антителом, содержащим референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования, при введении в комбинации с антигеном; увеличение продукции одного или нескольких цитокинов (необязательно выбранных из группы, состоящей из IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 и TNF- $\alpha$ ) из моДК в образце при введении в комбинации с антигеном, по сравнению с антителом, содержащим

референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования, при введении в комбинации с антигеном; и/или увеличение способности моДК стимулировать антиген-специфические CD4<sup>+</sup> Т-клетки при введении моДК в комбинации с антигеном, по сравнению с антителом, содержащим референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования, при введении моДК в комбинации с антигеном, причем, необязательно, (1) моДК и CD4<sup>+</sup> Т-клетки получены от одного и того же (необязательно вакцинированного антигеном) субъекта и/или (2) стимуляция антиген-специфических CD4<sup>+</sup> Т-клеток определяется по увеличению экспрессии CD25 и/или увеличению пролиферации (например, при определении по уменьшению окрашивания CFSE со временем) и/или увеличению экспрессии CD69 и/или увеличению экспрессии NFAT и/или увеличению экспрессии CD44, антиген-специфическими CD4<sup>+</sup> Т-клетками.

В некоторых вариантах осуществления, генно-инженерный Fc или фрагмент Fc по настоящему изобретению (или содержащий их полипептид) содержит две или более мутаций замены по сравнению с референсным Fc дикого типа или фрагментом Fc, и комбинированный эффект двух или более замен отличается от и, необязательно, превышает эффект, ожидаемый на основании эффектов мутаций замены индивидуальных компонентов и/или на основании эффектов подмножества двух или более мутаций замены. Другими словами, в некоторых вариантах осуществления, комбинированные мутации включают неаддитивный или синергичный эффект по отношению к мутациям индивидуальных компонентов и/или к их подмножеству.

В некоторых вариантах осуществления, раскрытые в данном документе варианты и содержащие их полипептиды обладают такими характеристиками, как эффекторные функции, способность связывать C1q человека, способность индуцировать FcγRA-опосредованную клеточную сигнализацию, способность связывать FcRn человека, способность промотировать АЗКФ, способность промотировать АЗКЦТ, способность промотировать активацию CD4<sup>+</sup> Т-клеток и т.п. В некоторых вариантах осуществления, генно-инженерный полипептид по настоящему изобретению содержит антитело, слитый белок Fc, или содержащий его конъюгат. Также предусматриваются антитела, которые содержат вариант Fc IgG в соответствии с настоящим изобретением.

В определенных вариантах осуществления, раскрытые в данном документе полипептиды и антитела имеют одну или несколько измененных характеристик (например, повышенное связывание с FcγRa человека, пониженное связывание с FcγRIIb

человека, связывание с FcγRa человека, повышенное по сравнению со связыванием с FcγRIIb, повышенное связывание с C1q человека, повышенное связывание с FcRn человека, повышенная Tm, повышенное связывание с FcγRIIIa, или любая их комбинация), по сравнению с референсным полипептидом или антителом, которое содержит вариант Fc, содержащий следующую мутацию (мутации): G236A; G236S; G236A/A330L/I332E; G236A/A330L/I332E/M428L/N434S; G236A/A330L/I332E/M428L/N434A; G236A/S239D/A330L/I332E; или A330L/I332E.

Также предусматриваются родственные полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева и композиции.

Раскрытые в данном документе композиции и способы полезны, в различных вариантах осуществления, для лечения и/или предотвращения болезни. В некоторых вариантах осуществления, раскрытая в данном документе композиция может быть введена на любой стадии заболевания (например, на ранней стадии инфекции, на поздней стадии инфекции, при диагностировании инфекции или в любой другой момент времени в ходе инфекции) и может защищать от и/или нейтрализовать инфекцию, способствовать клиренсу инфицированных клеток, блокировать распространение инфекции, стимулировать адаптивный иммунитет хозяина против инфекции и т.п.

Следует понимать, что в данном документе, «FcγRIIA» может быть назван «FcγRIIa», «FcγRIIIA» может быть назван «FcγRIIIa», «FcγRIIB» может быть назван «FcγRIIb», и «FcγRIIIB» может быть назван «FcγRIIb».

Перед более подробным изложением настоящего изобретения может оказаться полезным для его понимания дать определения некоторых терминов, используемых в данном документе. Дополнительные определения приведены в данном описании.

В данном описании, любой диапазон концентраций, диапазон процентного содержания, диапазон соотношений или диапазон целых чисел следует понимать как включающий значения любого целого числа в указанном диапазоне и, в соответствующих случаях, их дробные части (такие как одна десятая и одна сотая целого числа), если не указано иное. Также, любой числовой диапазон, указанный в данном документе, относящийся к любому физическому признаку, такому как полимерные субъединицы, размер или толщина, должен подразумевать включение любого целого числа в указанном диапазоне, если не указано иное. Используемый в данном документе термин «примерно» означает  $\pm 20\%$  от указанного диапазона, значения или структуры, если не указано иное. Например, в некоторых вариантах осуществления, термин «примерно» может относиться

к  $\pm 15\%$ ,  $\pm 10\%$  или  $\pm 5\%$  от указанного диапазона, значения или структуры. Следует понимать, что термины в единственном числе, используемые в данном документе, относятся к «одному или нескольким» из перечисленных компонентов. Использование альтернативы (например, «или») следует понимать как означающее любую одну из, обе, или любую комбинацию альтернатив. Используемые в данном документе термины «включать», «иметь» и «содержать» используются синонимично, причем указанные термины и их варианты должны истолковываться как неограничительные.

«Необязательный» или «необязательно» означает, что описанный в дальнейшем элемент, компонент, событие или обстоятельство могут иметь место или не иметь места, и что данное описание включает случаи, в которых указанный элемент, компонент, событие или обстоятельство имеют место, и случаи, когда они не имеют места.

Дополнительно, следует понимать, что индивидуальные конструкты, или группы конструктов, образованных из различных комбинаций структур и субъединиц, описанных в данном документе, раскрыты настоящим изобретением в такой же степени, как если бы каждый конструкт или группа конструктов был описан индивидуально. Таким образом, выбор конкретных структур или конкретных субъединиц входит в объем настоящего изобретения.

Термин «состоящий по существу из» не эквивалентен термину «включающий» и относится к указанным материалам или стадиям пункта формулы, или к тем, которые не оказывают существенного влияния на основные характеристики заявляемого объекта. Например, домен, область или модуль белка (например, связывающий домен, Fc, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> или CH<sub>1</sub>-CH<sub>3</sub>) или белок, «состоящий по существу из» конкретной аминокислотной последовательности, когда аминокислотная последовательность домена, области, модуля или белка включает удлиняющие сегменты, делеции, мутации или их комбинацию (например, аминокислоты на амино- или карбоксильном конце или между доменами), которые, в комбинации, составляют не более 20% (например, не более 15%, 10%, 8%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%) от длины домена, области, модуля или белка и существенно не влияют (т.е., снижают активность не более чем на 50%, например, не более чем на 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или 1%) на активность домена (доменов), области (областей), модуля (модулей), или белка (например, аффинность связывания мишени связывающего белка).

В определенных вариантах осуществления, вариант полипептида CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, CH<sub>1</sub>-CH<sub>3</sub> или Fc содержит одну или несколько аминокислотных замен по сравнению с

полипептидом дикого типа или исходным СН<sub>2</sub>, СН<sub>3</sub>, СН<sub>1</sub>-СН<sub>3</sub> или Fc, соответственно, причем одна или несколько аминокислотных замен включает, состоит по существу из, или состоит из конкретно указанной аминокислотной замены (замен). В некоторых вариантах осуществления, вариант полипептида СН<sub>2</sub>, СН<sub>3</sub>, СН<sub>1</sub>-СН<sub>3</sub> или Fc содержит только конкретно указанную мутацию (мутации) замены по сравнению с полипептидом дикого типа или исходным СН<sub>2</sub>, СН<sub>3</sub>, СН<sub>1</sub>-СН<sub>3</sub> или Fc, соответственно. В других вариантах осуществления, вариант полипептида СН<sub>2</sub>, СН<sub>3</sub>, СН<sub>1</sub>-СН<sub>3</sub> или Fc содержит конкретно указанную мутацию (мутации) замены и одну или несколько дополнительных аминокислотных мутаций замены (например, в некоторых вариантах осуществления, одну или несколько консервативных аминокислотных замен и/или одну или несколько аминокислотных мутаций замены, которые являются физически удаленными в третичной структуре полипептида Fc или его фрагмента от конкретно указанных одной или нескольких аминокислотных мутаций замены), при условии, что одна или несколько характеристик заявляемого объекта сохраняются или по существу сохраняются и существенно не изменяются, например, связывание с и/или активация одного или нескольких FcγR, связывание с FcRn, температура плавления, связывание с C1q, стимулирование АЗКЦТ, стимулирование АЗКФ, стимулирование КЗЦ, образование иммунного комплекса, активация дендритных клеток (например, дендритных клеток из моноцитов) при предъявлении в иммунном комплексе с антигеном и т.п. В некоторых вариантах осуществления, заявляемый объект, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, которые состоят по существу из указанных аминокислотных замен, представляет собой функциональный вариант заявляемого объекта, причем аминокислотная замена (замены) состоит (состоят) из указанной аминокислотной замены (замен).

При использовании в данном документе, «аминокислота» относится к природным и синтетическим аминокислотам, а также аминокислотным аналогам и аминокислотным миметикам, которые функционируют аналогично природным аминокислотам. Природные аминокислоты представляют собой аминокислоты, кодируемые генетическим кодом, а также аминокислоты, которые были впоследствии модифицированы, например, гидроксипролин, γ-карбоксиглутамат и O-фосфосерин. Аминокислотные аналоги относятся к соединениям, которые имеют такую же основную химическую структуру, что и встречающаяся в природе аминокислота, то есть α-углерод, связанный с водородом, карбоксильную группу, аминогруппу и группу R, например, гомосерин, норлейцин,

метионинсульфоксид, метионинметилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированные группы R (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют ту же основную химическую структуру, что и у природной аминокислоты. Аминокислотные миметики относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, отличную от общей химической структуры аминокислоты, но функционируют аналогично встречающейся в природе аминокислоте.

При использовании в данном документе, «мутация» относится к изменению в последовательности молекулы нуклеиновой кислоты или полипептидной молекулы по сравнению с референсной или дикого типа молекулой нуклеиновой кислоты или полипептидной молекулой, соответственно. Мутация может приводить к нескольким разным типам изменений в последовательности, включая замену, вставку или делецию нуклеотида (нуклеотидов) или аминокислоты (аминокислот). Примеры мутаций замены в полипептидах Fc и последовательностях Fc, содержащих их, приведены в Таблице 1 и в перечне последовательностей.

«Консервативная замена» относится к аминокислотным заменам, которые не влияют или не изменяют существенно характеристики связывания конкретного белка. В общем, консервативными являются замены, в которых замещенный аминокислотный остаток заменяется на аминокислотный остаток, имеющий схожую боковую цепь. Консервативные замены включают замены, входящие в одну из следующих групп: Группа 1: аланин (Ala или A), глицин (Gly или G), серин (Ser или S), треонин (Thr или T); Группа 2: аспарагиновая кислота (Asp или D), глутаминовая кислота (Glu или Z); Группа 3: аспарагин (Asn или N), глутамин (Gln или Q); Группа 4: аргинин (Arg или R), лизин (Lys или K), гистидин (His или H); Группа 5: изолейцин (Ile или I), лейцин (Leu или L), метионин (Met или M), валин (Val или V); и Группа 6: фенилаланин (Phe или F), тирозин (Tyr или Y), триптофан (Trp или W). Дополнительно или альтернативно, аминокислоты могут быть объединены в группы консервативных замен по схожей функции, химической структуре или составу (например, кислые, основные, алифатические, ароматические или серосодержащие). Например, алифатическая группа может включать, для целей замены, Gly, Ala, Val, Leu и Ile. Другие консервативные замены группы включают: серосодержащие: Met и цистеин (Cys или C); кислые: Asp, Glu, Asn и Gln; малые алифатические, неполярные или слегка полярные остатки: Ala, Ser, Thr, Pro и Gly; полярные, отрицательно заряженные остатки и их амиды: Asp, Asn, Glu и Gln; полярные, положительно заряженные остатки: His, Arg и Lys; большие алифатические, неполярные

остатки: Met, Leu, Ile, Val и Cys; и большие ароматические остатки: Phe, Tyr и Trp. Дополнительная информация приведена в Creighton (1984) Proteins, W.H. Freeman and Company.

При использовании в данном документе, «белок» или «полипептид» относится к полимеру аминокислотных остатков. Белки относятся к природным полимерам аминокислот, а также к полимерам аминокислот, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляет собой искусственный химический миметик соответствующей природной аминокислоты, и полимерам неприродных аминокислот. Также предусматриваются варианты белков, пептидов и полипептидов по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления, варианты белков, пептидов и полипептидов содержат или состоят из аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% идентична аминокислотной последовательности определенной или референсной аминокислотной последовательности, описанной в данном документе.

«Молекула нуклеиновой кислоты» или «полинуклеотид» или «полинуклеиновая кислота» относится к полимерному соединению, включающему ковалентно связанные нуклеотиды, которые могут состоять из природных субъединиц (например, пуриновых или пиримидиновых оснований) или неприродных субъединиц (например, морфолинового кольца). Пуриновые основания включают аденин, гуанин, гипоксантин и ксантин, и пиримидиновые основания включают урацил, тимин и цитозин. Молекулы нуклеиновых кислот включают полирибонуклеиновую кислоту (РНК), которая включает мРНК, микроРНК, миРНК, вирусную геномную РНК и синтетическую РНК, и полидезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), которая включает кДНК, геномную ДНК и синтетическую ДНК, любая из которых может быть одно- или двухцепочечной. Если молекула нуклеиновой кислоты является одноцепочечной, то она может быть кодирующей цепью или некодирующей (антисмысловой) цепью. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность, включает все нуклеотидные последовательности, которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Некоторые варианты нуклеотидных последовательностей могут также включать интрон(ы) в той степени, в которой эти интроны будут удалены посредством ко- или посттранскрипционных механизмов. Другими словами, разные нуклеотидные последовательности могут кодировать одну и ту же аминокислотную

последовательность вследствие избыточности или вырожденности генетического кода, или в результате сплайсинга.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид (например, мРНК) содержит модифицированный нуклеозид, структуру кэп-1 (cap-1), структуру кэп-2 (cap-2) или любую их комбинацию. В определенных вариантах осуществления, полинуклеотид содержит псевдоуридин, N6-метиладенозин, 5-метилцитидин, 2-тиоуридин или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, псевдоуридин представляет собой N1-метилпсевдоуридин. Эти признаки известны в данной области техники и описаны, например, в Zhang *et al. Front. Immunol.*, DOI=10.3389/fimmu.2019.00594 (2019); Eyster *et al. PNAS* 116(46): 23068-23071; DOI: 10.1073/pnas.1821754116 (2019); Nance and Meier, *ACS Cent. Sci.* 2021, 7, 5, 748–756; doi.org/10.1021/acscentsci.1c00197 (2021), и van Hoecke and Roose, *J. Translational Med* 17:54 (2019); <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1804-8>, причем указанные характеристики нуклеозидов и мРНК включены в данный документ посредством ссылки.

Также предусматриваются варианты молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Варианты молекул нуклеиновой кислоты являются на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, и предпочтительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% идентичными молекуле нуклеиновой кислоты определенного или референсного полинуклеотида, описанного в данном документе, или гибридизуются с полинуклеотидом в жестких условиях гибридизации с 0,015М хлорида натрия, 0,0015М цитрата натрия при примерно 65-68 °С, или с 0,015М хлорида натрия, 0,0015М цитрата натрия и 50% формамида при примерно 42 °С. Варианты молекул нуклеиновой кислоты сохраняют способность кодировать ее связывающий домен, обладающий функциональностью, описанной в данном документе, такой как связывание молекулы-мишени.

«Процент идентичности последовательности» относится к сопоставлению двух или более последовательностей, определяемому путем сравнения последовательностей. Предпочтительные способы определения идентичности последовательностей должны обеспечивать наилучшее совпадение сравниваемых последовательностей. Например, последовательности выравнивают с целью оптимального сравнения (например, могут быть введены гэпы в одну или в обе из первой и второй аминокислотных последовательностей или последовательностей нуклеиновых кислот для оптимального выравнивания). Кроме того, негомологичные последовательности могут не учитываться для целей сравнения. Процент идентичности последовательностей, указанный в данном

документе, рассчитывается по длине референсной последовательности, если не указано иное. Способы определения идентичности и сходства последовательностей можно найти в общедоступных компьютерных программах. Выравнивание последовательностей и расчеты процента идентичности можно проводить с использованием программы BLAST (например, BLAST 2.0, BLASTP, BLASTN или BLASTX). Математический алгоритм, использованный в программах BLAST, приведен в Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997. В контексте настоящего изобретения, следует понимать, что в случае использования для анализа последовательностей прикладных программ, результаты анализа основаны на «значениях по умолчанию» указанной программы. «Значения по умолчанию» означают любой набор значений или параметров, который изначально загружается вместе с программным обеспечением при его первой инициализации.

Термин «выделенный» означает, что материал извлечен из его исходного окружения (например, природной среды, если он имеет естественное происхождение). Например, природная нуклеиновая кислота или полипептид, присутствующие в живом животном, не являются выделенными, но те же самые нуклеиновая кислота или полипептид, отделенные от некоторых или всех материалов, сопутствующих им в природной системе, являются выделенными. Такая нуклеиновая кислота может быть частью вектора и/или такая нуклеиновая кислота или полипептид могут быть частью композиции (например, клеточного лизата), и при этом быть выделенными, поскольку такой вектор или композиция не являются частью природного окружения нуклеиновой кислоты или полипептида. «Выделенный» может, в некоторых вариантах осуществления, также описывать антитело, антигенсвязывающий фрагмент, полипептид, полинуклеотид, вектор, клетку-хозяина или композицию, находящиеся вне организма человека.

Термин «ген» означает сегмент ДНК или РНК, участвующий в продуцировании полипептидной цепи; в определенных контекстах он включает области, предшествующие и следующие за кодирующей областью (например, 5'-нетранслируемую область (UTR) и 3'-UTR), а также промежуточные последовательности (интроны) между отдельными кодирующими сегментами (экзонами).

«Функциональный вариант» относится к полипептиду или полинуклеотиду, который является структурно подобным или в значительной степени структурно подобным исходному или референсному соединению по настоящему изобретению, но незначительно отличается по составу (например, одно основание, атом или функциональная группа различаются, добавлены или удалены), вследствие чего

полипептид или кодируемый полипептид способен выполнять по меньшей мере одну функцию исходного полипептида с по меньшей мере 50% эффективностью, предпочтительно, с по меньшей мере 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9% или 100% уровнем активности исходного полипептида. Другими словами, функциональный вариант полипептида или кодируемого полипептида по настоящему изобретению имеет «схожее связывание», «схожую аффинность» или «схожую активность», когда функциональный вариант демонстрирует не более чем 50% снижения характеристики в выбранном анализе по сравнению с исходным или референсным полипептидом, таким как анализ измерения аффинности связывания (например, *Viacore*<sup>®</sup> или окрашивание тетрамером, для измерения константы ассоциации ( $K_a$ ) или диссоциации ( $K_D$ )).

При использовании в данном документе, «функциональная часть» или «функциональный фрагмент» относятся к полипептиду или полинуклеотиду, которые содержат только домен, часть или фрагмент исходного или референсного соединения, и полипептид или кодируемый полипептид сохраняет по меньшей мере 50% активности, связанной с указанным доменом, частью или фрагментом исходного или референсного соединения, предпочтительно по меньшей мере 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9% или 100% уровня активности исходного полипептида, или обеспечивает биологическое преимущество (например, эффекторную функцию). «Функциональная часть» или «функциональный фрагмент» полипептида или кодируемого полипептида по настоящему изобретению имеет «схожее связывание» или «схожую активность», когда функциональная часть или фрагмент демонстрирует не более чем 50% снижения характеристики в выбранном анализе по сравнению с исходным или референсным полипептидом (предпочтительно, не более чем на 20% или 10%, или не более чем на логарифмическую разность по сравнению с исходным или референсным значением для аффинности).

Используемый в данном документе термин «генно-инженерный», «рекомбинантный», или «неприродный» относится к организму, микроорганизму, клетке, молекуле нуклеиновой кислоты или вектору, которые включают по меньшей мере одно генетическое изменение или были модифицированы путем введения экзогенной или гетерологичной молекулы нуклеиновой кислоты, причем такие изменения или модификации введены с помощью генной инженерии (*m.e.*, в результате вмешательства человека). Генетические изменения включают, например, модификации с введением

экспрессируемых молекул нуклеиновых кислот, кодирующих функциональную РНК, белки, слитые белки или ферменты, или другие добавления, делеции, замены молекул нуклеиновой кислоты, или другие функциональные нарушения клеточного генетического материала. Дополнительные модификации включают, например, некодирующие регуляторные области, в которых модификации изменяют экспрессию полинуклеотида, гена или оперона.

При использовании в данном документе, «гетерологичный» или «неэндогенный» или «экзогенный» относятся к любому гену, белку, аминокислотной последовательности, соединению, молекуле нуклеиновой кислоты или активности, которые не являются нативными для клетки-хозяина или субъекта, или любому гену, белку, аминокислотной последовательности, соединению, молекуле нуклеиновой кислоты или активности, нативным для клетки-хозяина или субъекта, которые были изменены. Гетерологичный, неэндогенный или экзогенный включает гены, белки, аминокислотные последовательности, соединения или молекулы нуклеиновой кислоты, которые были мутированы или иначе изменены таким образом, чтобы структура, активность, или то и другое различались между нативными и измененными генами, белками, аминокислотными последовательностями, соединениями или молекулами нуклеиновой кислоты. В определенных вариантах осуществления, гетерологичные, неэндогенные или экзогенные гены, белки, аминокислотные последовательности или молекулы нуклеиновой кислоты (например, рецепторы, лиганды и т.д.) могут не быть эндогенными для клетки-хозяина или субъекта, но вместо этого нуклеиновые кислоты, кодирующие такие гены, белки, аминокислотные последовательности или молекулы нуклеиновой кислоты, могут добавлены в клетку-хозяина путем конъюгации, трансформации, трансфекции, электропорации и т.п., причем добавленная молекула нуклеиновой кислоты может интегрироваться в геном клетки-хозяина или может существовать в виде внехромосомного генетического материала (например, в виде плазмиды или другого самореплицирующегося вектора). Термин «гомологичный» или «гомолог» относится к гену, белку, аминокислотной последовательности, соединению, молекуле нуклеиновой кислоты или активности, присутствующих в или получаемых от клетки-хозяина, вида или штамма. Например, гетерологичный или экзогенный полинуклеотид или ген, кодирующий полипептид, могут быть гомологичными нативному полинуклеотиду или гену и кодировать гомологичный полипептид или активность, но полинуклеотид или полипептид могут иметь измененную структуру, последовательность, уровень экспрессии, или любую

их комбинацию. Неэндогенный полинуклеотид или ген, а также кодируемый полипептид или активность может принадлежать тому же виду, другому виду или их комбинации.

В определенных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты или ее часть, нативная клетке-хозяину, будет считаться гетерологичной клетке-хозяину, если она была изменена или мутирована, или молекула нуклеиновой кислоты, нативная клетке-хозяину, может считаться гетерологичной, если она была изменена с помощью гетерологичной контрольной последовательности экспрессии или была изменена с помощью эндогенной контрольной последовательности экспрессии, обычно не связанной с молекулой нуклеиновой кислоты, нативной клетке-хозяину. Дополнительно, термин «гетерологичный» может относиться к биологической активности, которая отличается, изменена, или не является эндогенной для клетки-хозяина. Как описано в данном документе, более одной гетерологичной молекулы нуклеиновой кислоты может быть введено клетке-хозяину в виде отдельных молекул нуклеиновой кислоты, в виде множества индивидуально контролируемых генов, в виде полицистронной молекулы нуклеиновой кислоты, в виде единой молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок, или любой их комбинацией. Используемый

в данном документе термин «эндогенный» или «нативный» относится к полинуклеотиду, гену, белку, соединению, молекуле или активности, которые обычно присутствуют в клетке-хозяине или субъекте.

Термин «экспрессия», используемый в данном документе, относится к процессу продуцирования полипептида на основе кодирующей последовательности молекулы нуклеиновой кислоты, такой как ген. Процесс может включать транскрипцию, посттранскрипционный контроль, посттранскрипционную модификацию, трансляцию, посттрансляционный контроль, посттрансляционную модификацию, или любую их комбинацию. Экспрессированная молекула нуклеиновой кислоты типично функционально связана с контрольной последовательностью экспрессии (например, промотором).

Термин «функционально связанный» относится к ассоциации двух или более молекул нуклеиновой кислоты на одном фрагменте нуклеиновой кислоты, так чтобы функция одной из них зависела от другой. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, когда он способен влиять на экспрессию этой кодирующей последовательности (т.е., кодирующая последовательность находится под транскрипционным контролем указанного промотора). «Несвязанный» означает, что

ассоциированные генетические элементы тесно не связаны друг с другом и функция одного из них не влияет на другой.

Как описано в данном документе, более одной гетерологичной молекулы нуклеиновой кислоты может быть введено клетке-хозяину в виде отдельных молекул нуклеиновой кислоты, в виде множества индивидуально контролируемых генов, в виде полицистронной молекулы нуклеиновой кислоты, в виде единой молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей белок (например, тяжелую цепь антитела), или любой их комбинацией. Когда две или более гетерологичных молекулы нуклеиновой кислоты вводят клетке-хозяину, следует понимать, что две или более гетерологичных молекул нуклеиновой кислоты могут быть введены как одна молекула нуклеиновой кислоты (например, на одном векторе), на разных векторах, интегрированными в один сайт или в несколько сайтов хромосомы-хозяина, или любой их комбинацией. Число референсных гетерологичных молекул нуклеиновой кислоты или белковых активностей относится к числу кодирующих молекул нуклеиновой кислоты или числу белковых активностей, а не к числу отдельных молекул нуклеиновой кислоты, вводимых клетке-хозяину.

Термин «конструкт» относится к любому полинуклеотиду, который содержит рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты (или, когда это четко указано в контексте, слитый белок по настоящему изобретению). (Полинуклеотидный) конструкт может находиться в векторе (например, бактериальном векторе, вирусном векторе) или может быть интегрирован в геном. «Вектор» представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая способна транспортировать другую молекулу нуклеиновой кислоты. Векторы могут быть, например, плазмидами, космидами, вирусами, РНК-вектором или линейной или кольцевой ДНК или РНК молекулой, которые могут включать хромосомные, нехромосомные, полусинтетические или синтетические молекулы нуклеиновой кислоты. Векторы по настоящему изобретению также включают системы транспозонов (например, «Спящая красавица», см., например, *Geurts et al., Mol. Ther.* 8:108, 2003; *Mátés et al., Nat. Genet.* 41:753, 2009). В качестве примеров можно указать векторы, способные к автономной репликации (эписомальный вектор), способные доставлять полинуклеотид в геном клетки (например, вирусный вектор) или способные экспрессировать молекулы нуклеиновых кислот, с которыми они связаны (экспрессионные векторы).

При использовании в данном документе, «экспрессионный вектор» или «вектор» относится к ДНК-конструкту, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, которая

функционально связана с пригодной контрольной последовательностью, способной обеспечивать экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты в подходящем хозяине. Такие контрольные последовательности включают промотор для осуществления транскрипции, необязательную операторную последовательность для контроля такой транскрипции, последовательность, кодирующую подходящие мРНК-сайты связывания рибосом, и последовательности, которые контролируют терминацию транскрипции и трансляции. Вектор может быть плазмидой, фаговой частицей, вирусом или просто потенциальной геномной вставкой. После трансформации в подходящего хозяина, вектор может реплицироваться и функционировать независимо от генома хозяина, или может, в некоторых случаях, сам интегрироваться в геном или доставлять содержащийся в векторе полинуклеотид в геном без векторной последовательности. В описании настоящего изобретения, «плазида», «экспрессионная плазида», «вирус» и «вектор» часто используются взаимозаменяемо.

Термин «введенный» в контексте внедрения молекулы нуклеиновой кислоты в клетку означает «трансфекцию», «трансформацию» или «трандукцию» и содержит ссылку на включение молекулы нуклеиновой кислоты в эукариотическую или прокариотическую клетку, причем молекула нуклеиновой кислоты может быть включена в геном клетки (например, хромосому, плазмиду, пластиду или митохондриальную ДНК), конвертирована в автономный репликон или транзистентно экспрессирована (например, трансфицированная мРНК).

В определенных вариантах осуществления, полинуклеотиды по настоящему изобретению могут быть функционально связаны с определенными элементами вектора. Например, полинуклеотидные последовательности, необходимые для обеспечения экспрессии и процессинга кодирующей последовательности, с которой они лигированы, могут быть функционально связанными. Контрольные последовательности экспрессии могут включать соответствующие последовательности инициации транскрипции, терминации, промоторные и энхансерные последовательности; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования; последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (*m.e.*, консенсусные последовательности Козака); последовательности, которые повышают стабильность белка; и возможно последовательности, которые усиливают секрецию белка. Контрольные последовательности экспрессии могут быть функционально связанными, если они

примыкают к гену, представляющему интерес, и являются *транс*-действующими или действующими на расстоянии контрольными последовательностями экспрессии, контролирующими ген, представляющий интерес.

В определенных вариантах осуществления, вектор содержит плазмидный вектор или вирусный вектор (например, лентивирусный вектор или  $\gamma$ -ретровирусный вектор). Вирусные векторы включают ретровирусы, аденовирусы, парвовирусы (например, аденоассоциированные вирусы), коронавирусы, РНК-содержащие вирусы с отрицательной цепью, такие как ортомиксовирусы (например, вирус гриппа), рабдовирусы (например, вирус бешенства и везикулярного стоматита), парамиксовирусы (например, кори и Сендай), РНК-содержащие вирусы с положительной цепью, такие как пикорнавирусы и альфавирусы, и вирусы с двухцепочечной ДНК, включающие аденовирусы, герпесвирусы (например, вирус простого герпеса типов 1 и 2, вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус), и поксвирусы (например, коровьей оспы, оспы кур и оспы канареек). Другие вирусы включают, например, вирус Норуолк, тогавирус, флавивирус, реовирусы, паповавирус, гепаднавирус и вирус гепатита. Примеры ретровирусов включают птичий лейкоз-саркому, вирусы млекопитающих С-типа, вирусы В-типа, вирусы D-типа, группу HTLV-BLV (Т-лимфотропный вирус человека - вирус лейкоза крупного рогатого скота), лентивирусы, спумавирусы (Coffin, J. M., Retroviridae: The viruses and their replication, In Fundamental Virology, Third Edition, B. N. Fields et al., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996).

«Ретровирусы» представляют собой вирусы, имеющие РНК-геном, который обратно транскрибируется в ДНК с использованием фермента обратной транскриптазы, и обратно транскрибированная ДНК затем включается в геном клетки-хозяина.

«Гаммаретровирус» относится к роду семейства ретровирусов. Примеры гаммаретровирусов включают вирус стволовых клеток мыши, вирус мышинового лейкоза, вирус лейкоза кошачих, вирус саркомы кошачих и вирусы ретикулоэндотелиоза птиц.

«Лентивирусные векторы» включают лентивирусные векторы на основе ВИЧ для доставки генов, которые могут быть интегративными или неинтегративными, иметь относительно большую упаковочную способность, и могут трансдуцировать определенный диапазон разных типов клеток. Лентивирусные векторы обычно получают после транзientной трансфекции трех (упаковочной, оболочечной и трансферной) или более плазмид в клетки-продуценты. Как и ВИЧ, лентивирусные векторы проникают в клетку-мишень в результате взаимодействия вирусных поверхностных гликопротеинов с

рецепторами на клеточной поверхности. После проникновения, вирусная РНК подвергается обратной транскрипции, которая опосредована комплексом вирусной обратной транскриптазы. Продукт обратной транскрипции представляет собой двухцепочечную линейную вирусную ДНК, которая является субстратом для вирусной интеграции в ДНК инфицированных клеток.

В определенных вариантах осуществления, вирусный вектор может быть гаммаретровирусом, например, векторами на основе вируса мышинного лейкоза Молони (MLV). В других вариантах осуществления, вирусный вектор может быть вектором на основе более сложного ретровируса, например, вектором на основе лентивируса. К этой категории принадлежат векторы на основе ВИЧ-1. Другие примеры включают лентивирусные векторы, полученные на основе ВИЧ-2, вируса иммунодефицита кошачьих (FIV), вируса инфекционной анемии лошадей, вируса иммунодефицита обезьян (SIV) и вируса меди-висна (лентивирус овец). Способы использования ретровирусных и лентивирусных вирусных векторов и упаковывающих клеток для трансдукции клеток-хозяев млекопитающих вирусными частицами, содержащими трансгены, известны в данной области техники и были описаны ранее, например, в: патенте США № 8119772; Walchli *et al.*, *PLoS One* 6:327930, 2011; Zhao *et al.*, *J. Immunol.* 174:4415, 2005; Engels *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 14:1155, 2003; Frecha *et al.*, *Mol. Ther.* 18:1748, 2010; и Verhoeven *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 506:97, 2009. Ретровирусные и лентивирусные векторные конструкции и экспрессионные системы также являются коммерчески доступными. Другие вирусные векторы также могут быть использованы для доставки полинуклеотидов, включая ДНК-вирусные векторы, включая, например, векторы на основе аденовирусов и векторы на основе аденоассоциированных вирусов (AAV); векторы, полученные из вирусов простого герпеса (ВПГ), включая ампликон-векторы, дефектные по репликации ВПГ, и аттенуированные ВПГ (Kriskey *et al.*, *Gene Ther.* 5:1517, 1998).

Другие векторы, которые могут быть использованы с композициями и способами по настоящему изобретению, включают полученные из бакуловирусов и  $\alpha$ -вирусов. (Jolly, D J. 1999. Emerging Viral Vectors. pp 209-40 in Friedmann T. ed. The Development of Human Gene Therapy. New York: Cold Spring Harbor Lab), или плазмидные векторы (такие как «спящая красавица» или другие транспозон-векторы).

Когда геном вирусного вектора содержит множество полинуклеотидов, которые должны экспрессироваться в клетке-хозяине как отдельные транскрипты, вирусный вектор может также содержать дополнительные последовательности между двумя (или

более) транскриптами, позволяющие обеспечить бицистронную или мультицистронную экспрессию. Примеры таких последовательностей, используемых в вирусных векторах, включают участки внутренней посадки рибосомы (IRES), сайты расщепления фурином, вирусный 2A пептид или любую их комбинацию.

Плазмидные векторы, включающие антитело на основе ДНК, или кодирующие антигенсвязывающий фрагмент плазмидные векторы для прямого введения субъекту, описаны далее в данном документе.

Используемый в данном документе термин «хозяин» относится к клетке или микроорганизму, предназначенным для генетической модификации с использованием гетерологичной молекулы нуклеиновой кислоты для получения представляющего интерес полипептида (например, антитела по настоящему изобретению). Клетка-хозяин может включать любую индивидуальную клетку или клеточную культуру, которые могут принимать вектор, встраивать нуклеиновые кислоты или экспрессировать белки. Термин также охватывает потомство клетки-хозяина, генетически или фенотипически одинаковое с ней или отличающееся. Пригодные клетки-хозяева могут зависеть от вектора и могут включать клетки млекопитающих, клетки животных, клетки человека, клетки обезьян, клетки насекомых, дрожжевые клетки и бактериальные клетки. Такие клетки могут быть индуцированы для включения вектора или другого материала путем использования вирусного вектора, трансформации посредством осаждения фосфатом кальция, DEAE-декстраном, электропорацией, микроинъекцией или другими методами. См., например, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2d ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).

В контексте заболевания, «хозяин» может относиться к клетке или субъекту, имеющим заболевание. Например, как описано далее в данном документе, вариант полипептида Fc может быть введен для улучшения или модулирования иммунного ответа хозяина против патогена и т.п., поражающего хозяина.

«Антиген» или «Ag», при использовании в данном документе, относится к иммуногенной молекуле, которая вызывает иммунный ответ. Такой иммунный ответ может включать продуцирование антител, активацию специфических иммунологически компетентных клеток, фиксацию комплемента, антитело-зависимую клеточно опосредованную цитотоксичность (также называемую антитело-зависимой клеточной цитотоксичностью), антитело-зависимый клеточный фагоцитоз, продуцирование цитокинов, или любую их комбинацию. Антиген (иммуногенная молекула) может быть,

например, пептидом, гликопептидом, полипептидом, гликополипептидом, полинуклеотидом, полисахаридом, липидом и т.п. Очевидно, что антиген может быть синтезирован, получен рекомбинантным методом или выделен из биологического образца. Примеры биологических образцов, которые могут содержать один или несколько антигенов, включают образцы тканей, образцы стула, клетки, биологические жидкости или их комбинации. Антигены могут продуцироваться клетками, которые были модифицированы или сконструированы методами генной инженерии для экспрессии антигена. Антигены могут также присутствовать в бетакоронавирусе (например, поверхностный гликопротеин или его часть), например, присутствовать в вирионе, или экспрессироваться или презентироваться на поверхности клетки, инфицированной бетакоронавирусом.

Термин «эпитоп» или «антигенный эпитоп» включает любую молекулу, структуру, аминокислотную последовательность или белковый детерминант, который распознается и специфически связывается когнатной связывающей молекулой, такой как иммуноглобулин, или другой связывающей молекулой, доменом или белком. Эпитопные детерминанты обычно содержат химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. В тех случаях, когда антиген представляет собой или содержит пептид или белок, эпитоп может состоять из последовательно расположенных аминокислот (например, линейный эпитоп), или может состоять из аминокислот из разных частей или областей белка, которые сближаются при укладке белка (например, прерывистый или конформационный эпитоп), или несмежных аминокислот, расположенных близко друг к другу независимо от укладки белка.

### ***Варианты полипептида Fc и содержащие их полипептиды***

Настоящее изобретение предусматривает, в частности, генно-инженерные варианты полипептидов Fc иммуноглобулина G (IgG) и их фрагменты или части, и содержащие их белки (например, антитела и слитые белки). Для справки укажем, что Fc-область (также называемая «Fc-домен») антитела может взаимодействовать с рецепторами Fc и другими партнерами связывания, такими как C1q компонента, например, для инициации, участия и/или опосредования иммунного ответа против патогена или антигена. Раскрытые в данном документе варианты Fc обладают различными преимуществами по сравнению с нативными (*m.e.* дикого типа) Fc и/или известными

вариантами Fc, такими как, без ограничений, повышенное связывание с одним или несколькими активированным или активирующим рецептором Fc (например, FcγRIIa), пониженное связывание с ингибирующим рецептором Fc (например, FcγRIIb), обеспечение относительного увеличения связывания с активирующим рецептором Fc по сравнению с ингибирующим рецептором Fc, связывание с C1q компонента, содействие или увеличение антитело-зависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ), содействие или увеличение антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦТ), содействие или увеличение компонента, содействие или увеличение внутриклеточной сигнализации, которая осуществляется через активирующий рецептор Fc, уменьшение внутриклеточной сигнализации, которая осуществляется через ингибирующий рецептор Fc, обеспечение относительного увеличения сигнализации через активирующий рецептор Fc по сравнению с сигнализацией через ингибирующий рецептор Fc, содействие или увеличение активации дендритных клеток (например, дендритных клеток из моноцитов) при предъявлении им комплекса (несущее вариант Fc) антитело-антиген и т.п. В определенных вариантах осуществления, раскрытые в данном документе варианты Fc обладают улучшенной термической стабильностью (например, более высокой T<sub>m</sub>, или T<sub>m</sub>, более близкой к значению T<sub>m</sub> для полипептида Fc дикого типа), аналогичная или улучшенная способность к продуцированию и/или очистке, и/или благоприятное связывание с FcRn, например, по сравнению с референсным полипептидом Fc дикого типа или вариантом полипептида Fc, который не содержит указанную мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования.

Как описано далее в данном документе, иммуноглобулины типично включают два полипептида тяжелой цепи. Тяжелая цепь иммуноглобулина типично включает переменную область (также называемую переменным доменом) и константную область (также называемую константным доменом). В случае, например, изотипа IgG, константная область обычно содержит область CH1, шарнир, CH2 и CH3. Мономеры тяжелых цепей полипептидов могут ассоциироваться и удерживаться вместе общими дисульфидными связями с образованием димера; участки CH2-CH3 димера тяжелых цепей иммуноглобулина содержат участок или домен Fc (кристаллизующийся фрагмент) иммуноглобулина, например, антитела IgG1. Пример аминокислотной последовательности CH1-CH3 IgG1 человека дикого типа представлен в SEQ ID NO:1. Пример шарнира-CH2-CH3 IgG1 человека дикого типа представлен в SEQ ID NO:2. Пример CH2 IgG1 человека дикого типа представлен в SEQ ID NO:3. Пример аминокислотной последовательности CH3 IgG1 человека дикого типа представлен в SEQ

ID NO:4. Пример аминокислотной последовательности шарнир-СН2 IgG1 человека дикого типа представлен в SEQ ID NO:5. Следует понимать, что шарнир в полипептиде шарнир-СН2 или полипептиде шарнир-Fc может содержать одну или несколько модификаций (например, мутаций) по сравнению с последовательностью шарнира дикого типа, причем указанные одна или несколько модификаций могут быть дополнительными к, например, мутации P230A или S219Y, как раскрыто в данном документе.

При использовании в данном документе, если из контекста не следует иное, «полипептид Fc» относится к полипептиду СН2-СН3. Фрагмент полипептида Fc может содержать СН2, часть СН2, СН3 и/или часть СН3, но не включать весь полноразмерный СН2-СН3. В определенных вариантах осуществления, предусматриваются фрагменты полипептида Fc, которые содержат часть СН2 и/или СН3 достаточной длины для того, чтобы они включали указанное аминокислотное положение (положения) и варианты и, в некоторых вариантах осуществления, обладали указанной функцией или функциями.

Раскрытые в данном документе полипептиды включают содержащие вариант полипептида Fc IgG или его фрагмент, причем указанный вариант содержит одну или несколько модификаций по сравнению с полипептидом Fc IgG или его фрагментом. Следует понимать, что, если не указано иное, «референсный» полипептид или антитело (например, референсный полипептид Fc IgG или его фрагмент, референсное антитело, референсный полипептид СН2, референсный шарнир-СН2 IgG, референсный полипептид шарнир-Fc IgG, референсный полипептид СН3) является предпочтительно идентичным указанной молекуле (например, варианту полипептида Fc или его фрагменту; полипептиду, содержащему такой вариант; антителу, содержащему вариант полипептида Fc), за исключением указанного отличия или отличий.

Например, следует понимать, что для варианта полипептида Fc IgG1, который содержит аминокислоту аланин (А) в положении 236 по EU, референсный полипептид Fc включает полипептид Fc IgG1, который в остальном идентичен указанному варианту, за исключением того, что в положении 236 по EU находится нативная аминокислота глицин (G). В качестве другого примера, для варианта фрагмента полипептида Fc (например, содержащего СН2 и часть СН3), референсный фрагмент полипептида Fc предпочтительно имеет идентичную длину с указанным вариантом и предпочтительно отличается от указанного варианта только указанными признаками (например, аминокислотной мутацией или мутациями, присутствующими в варианте). В некоторых вариантах осуществления, референсный полипептид Fc, фрагмент полипептида Fc или антитело

содержат аминокислотную последовательность дикого типа (например, IgG1 человека дикого типа). За исключением указанных отличий, присутствующих в варианте, референсный полипептид Fc, фрагмент полипептида Fc или антитело будут принадлежать к тому же изотипу и, предпочтительно, к тому же аллотипу, что и вариант. В случае референсного антитела, Fab или другие антигенсвязывающие домены будут предпочтительно идентичными присутствующим в указанном антителе, содержащем вариант полипептида Fc или его фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления, полипептиды вариантов Fc IgG или их фрагменты включают одну или несколько аминокислотных замен по сравнению с референсным (например, дикого типа) полипептидом Fc IgG или его фрагментом. В данном документе, положение аминокислоты в полипептиде варианта Fc IgG или фрагменте может быть описано со ссылкой на «положение по EU»; следует понимать, что «положение по EU» соответствует системе нумерации EU, описанной Kabat. В качестве иллюстрации, следует понимать, что в примере аминокислотной последовательности CH1-CH3 IgG1 человека, представленной в SEQ ID NO:1, первая аминокислота (A) соответствует положению 118 по EU, и последняя аминокислота (K) соответствует положению 447 по EU:

```
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
```

(SEQ ID NO:1)

Соответственно, следует понимать, что, если не указано иное, положение указанной аминокислоты (аминокислот) соответствует нумерации EU для IgG1 человека, даже если полная тяжелая цепь антитела, полные CH1-CH3, полные CH2-CH3 и т.п. не присутствуют или явно не указаны. Другими словами, например, если описаны только шарнир-CH2 и CH3 и/или CH1 могут не присутствовать, положение аминокислоты в шарнире-CH2 описывается со ссылкой на нумерацию EU, если не указано иное. Соответствие между нумерацией EU, нумерацией по Кабату (Kabat), нумерацией экзонов IMGT и уникальной нумерацией IMGT для константного домена тяжелой цепи иммуноглобулина G известно в

данной области техники и представлено, например, в IMGT Scientific chart ([www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu\\_IGHGnber.html](http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html); создан 17 мая 2001 г., доступ осуществлен 23 мая 2021 г., последнее обновление 20 января 2020 г.).

В Примерах настоящего изобретения были сгенерированы некоторые варианты Fc (экспрессированы в фукозилированное и афукозилированное антитела IgG1 человека различных аллотипов) и тестировались на различные свойства. Некоторые варианты осуществления вариантов Fc по настоящему изобретению (фукозилированные, если не указано иное) и их неограничительные свойства сведены в Таблице 1; см. также Фиг. 10A-1-10C.

**Таблица 1. Некоторые варианты Fc и их свойства**

<b>Вариант (мутация (мутации) замены по сравнению с Fc IgG1 человека дикого типа)</b>	<b>Некоторые свойства указанного варианта (вариантов), по сравнению с фукозилированным IgG1 человека дикого типа</b>
G236A_L328V_Q295E	Повышенное связывание с FcγRIIIa человека (аллель H131 и аллель R131); сопоставимое или пониженное связывание с FcγRIIIb человека (например, по результатам анализа методом MSD и/или поверхностного плазмонного резонанса); повышенное отношение связывания с FcγRIIIa человека (аллель H131 или аллель R131) по сравнению со связыванием с FcγRIIIb человека; сопоставимое связывание с FcRn человека; сопоставимый продуцируемый титр; повышенная сигнализация в клетке-хозяине через FcγRIIIa и/или пониженная сигнализация в клетке-хозяине через FcγRIIIb; Tm отличается от дикого типа не более чем на 12 °C или меньше;
G236A_P230A_Q295E	
G236A_R292P_I377N	
G236A_K334A_Q295E	
G236S_R292P_Y300L	G236S_R292P_Y300L имеет улучшенное связывание с C1q
G236A_Y300L	Повышенное связывание с FcγRIIIa человека (H131 (более 18-кратного) и R131 (более 4-кратного)); близкое по значению связывание с FcγRIIIb человека или пониженное связывание с FcγRIIIb человека (например, измеренное методом поверхностного плазмонного резонанса);

<b>Вариант (мутация (мутации) замены по сравнению с Fc IgG1 человека дикого типа)</b>	<b>Некоторые свойства указанного варианта (вариантов), по сравнению с фукозилированным IgG1 человека дикого типа</b>
	<p>повышенное отношение связывания с FcγRIIa человека (H131 или R131) по сравнению со связыванием с FcγRIIb человека; сопоставимое связывание с FcRn человека; сопоставимый продуцируемый титр; повышенная сигнализация в клетке-хозяине через FcγRIIa и/или пониженная сигнализация в клетке-хозяине через FcγRIIb; Tm отличается от дикого типа не более чем на 4,5 °C</p>
G236A_R292P_Y300L	<p>Повышенное связывание с FcγRIIa человека (H131 (более 14-кратного) и R131 (более 2,7-кратного)); близкое по значению связывание с FcγRIIb человека; повышенное отношение связывания с FcγRIIa человека (H131 или R131) по сравнению со связыванием с FcγRIIb человека; повышенное связывание с FcγRIIIa человека (аллель V158 и аллель F158); сопоставимое связывание с FcRn человека; сопоставимый продуцируемый титр; повышенная сигнализация в клетке-хозяине через FcγRIIa и/или FcγRIIIa, и/или пониженная сигнализация в клетке-хозяине через FcγRIIb; повышенная сигнализация в клетке-хозяине через FcγRIIa и/или пониженная сигнализация в клетке-хозяине через FcγRIIb; Tm отличается от дикого типа не более чем на 4 °C; сопоставимое связывание с C1q человека</p>
G236S_G420V_G446E_L309T	<p>Повышенное связывание с FcγRIIa человека; пониженное связывание с FcγRIIb человека (менее 0,5-кратного);</p>
G236A_R292P	<p>повышенное отношение связывания с FcγRIIa человека (H131 или R131) по сравнению со связыванием с FcγRIIb человека; сопоставимое связывание с FcRn человека; сопоставимый продуцируемый титр; повышенная сигнализация в клетке-хозяине через FcγRIIa и/или</p>

Вариант (мутация (мутации) замены по сравнению с Fc IgG1 человека дикого типа)	Некоторые свойства указанного варианта (вариантов), по сравнению с фукозилированным IgG1 человека дикого типа
	FcγRIIIa, и/или пониженная сигнализация в клетке-хозяине через FcγRIIb; Tm отличается от дикого типа не более чем на 4 °C или меньше
R292P_Y300L	Повышенное связывание с FcγRIIIa человека (V158 и F158); повышенное связывание с C1q человека; Tm отличается от дикого типа не более чем на 4 °C
Y300L	Повышенное связывание с C1q человека
E345K_G236S_L235Y_S267E	
E272R_L309T_S219Y_S267E	
G236Y	
G236W	
F243L_G446E_P396L_S267E	
G236A (афукозилированный)	Повышенное связывание с FcγRIIIa человека (H131) и FcγRIIIa мыши (R131), пониженное связывание с FcγRIIb человека, повышенное связывание с FcγRIIIa человека (V158) и FcγRIIIa мыши (F158), повышенное связывание с FcγRIIIb человека, несколько пониженное связывание с FcRn человека, Tm отличается не более чем на 0,15 °C от дикого типа, или не более чем на 0,9 °C от дикого типа, или не более чем на 0,8 °C от дикого типа, или не более чем на 0,7 °C от дикого типа
S239D_H268E_G236A	Повышенное связывание с и сигнализация через все протестированные FcγR человека: FcγRIIA (H131); FcγRIIA (R131); FcγRIIB; FcγRIIA (V158); FcγRIIA (F158); FcγRIIB; дополнительно, когда анти-HBV антитело, несущее S239D_H268E_G236A_M428L_N434S, связывалось с HBsAg, образующиеся при этом иммунные

<b>Вариант (мутация (мутации) замены по сравнению с Fc IgG1 человека дикого типа)</b>	<b>Некоторые свойства указанного варианта (вариантов), по сравнению с фукозилированным IgG1 человека дикого типа</b>
	комплексы инкубировали с моДК; последующая инкубация моДК с донорскими CD4+ Т-клетками приводила к повышенному проценту NFAT+CD69+ CD3+CD4+ Т-клеток по сравнению с антителами, несущими только M428L_N434S.

Дополнительные характеристики раскрытых вариантов Fc-содержащих антител представлены в Примерах и на фигурах настоящего изобретения и описаны в данном документе. Например, Фиг. 10В-1-10-В-4 демонстрируют некоторые свойства антител, содержащих некоторые афукозилированные варианты Fc.

Следует понимать, что две или более аминокислотных замен, присутствующих в варианте, могут обозначаться по-разному, например, как G236A\_Y300L, или как G236A/Y300L. Кроме того, мутация или комбинированная мутация может обозначаться с использованием краткой формы, включающей исходную аминокислоту (аминокислоты) и аминокислоту (аминокислоты) полученную в результате замены (замен). Например, G236A может быть описана как «GA» или «236A»; G236A\_Y300L может быть описана как «GAYL»; G236A\_L328V\_Q295E может быть описана как «GALVQE»; G236A\_R292P\_Y300L может быть описана как «GARPYL», G236A\_R292P\_I377N может быть описана как «GARPIN» и т.п.

В любом из раскрытых в данном документе вариантах осуществления, вариант полипептида Fc или его фрагмент может быть получен из или содержать полипептид Fc человека или его фрагмент, и/или может быть получен из или содержать изотип IgG1 человека, IgG2 человека, IgG3 человека, или IgG4 человека. В этом контексте, выражение «получен из» означает, что вариант является таким же, как референсный полипептид или изотип, за исключением указанной модификации (модификаций) (например, аминокислотной замены (замен)). В качестве примера, вариант полипептида Fc, который содержит аминокислотную последовательность Fc IgG1 человека дикого типа, за исключением аминокислотных мутаций замены G236A\_L328V\_Q295E (и, необязательно, других аминокислотных замен) может быть назван «полученным из» Fc IgG1 человека

дикого типа. В любых из раскрытых в данном документе вариантах осуществления, полипептид, CH<sub>2</sub>, Fc, фрагмент Fc или антитело могут содержать последовательность Ig человека, такую как последовательность IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления, полипептид, CH<sub>2</sub>, Fc, фрагмент Fc, или антитело могут содержать нативную или дикого типа последовательность Ig человека, за исключением описанной мутации (мутаций), или может содержать последовательность Ig человека (например, IgG), которая содержит одну или несколько дополнительных мутаций.

В определенных вариантах осуществления, полипептид содержит только указанные или перечисленные аминокислотные мутации (например, замены), и не содержит каких-либо дополнительных аминокислотных замен или мутаций; например, по сравнению с референсным полипептидом (например, полипептидом Fc дикого типа или его фрагментом). Например, в некоторых вариантах осуществления, вариант полипептида Fc, содержащий аминокислотные замены G236A\_Y300L, не содержит каких-либо других аминокислотных замен; *т.е.*, содержит аминокислотную последовательность, соответствующую дикому типу, за исключением G236A и Y300L.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид может содержать одну или несколько дополнительных аминокислотных мутаций (например, замен), которые могут быть указаны (например, M428L\_N434S; M428L\_N434A). В некоторых вариантах осуществления, дополнительная аминокислотная мутация или мутации физически удалена от указанных положений аминокислот в третичной структуре, и/или имеет такую природу (например, *представляет собой* консервативную замену), что одна или несколько функций указанного варианта Fc или его фрагмента не снижается или снижается не более чем на 50%, не более чем на 40%, не более чем на 30%, не более чем на 25%, не более чем на 20%, не более чем на 15%, не более чем на 10% или не более чем на 5%, или не более чем 10-кратно, не более чем 9-кратно, не более чем 8-кратно, не более чем 7-кратно, не более чем 6-кратно, не более чем 5-кратно, не более чем 4-кратно, не более чем 3-кратно, не более чем 2-кратно, или не более чем 1,5-кратно. В некоторых вариантах осуществления, полипептид содержит мутации M428L и N434S или мутации M428L и N434A, или любую другую мутацию (мутации), которая усиливает связывание с FcRn человека, включая описанные в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления, обеспечивается полипептид, который содержит по меньшей мере часть CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> или шарнир-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> или CH<sub>1</sub>-CH<sub>3</sub> IgG1 (например, человека), содержащие аминокислотную мутацию (мутации), указанные в

любом из (i)-(xviii): (i) G236A, L328V и Q295E; (ii) G236A, P230A и Q295E; (iii) G236A, R292P и I377N; (iv) G236A, K334A и Q295E; (v) G236S, R292P и Y300L; (vi) G236A и Y300L; (vii) G236A, R292P и Y300L; (viii) G236S, G420V, G446E и L309T; (ix) G236A и R292P; (x) R292P и Y300L; (xi) G236A и R292P; (xii) Y300L; (xiii) E345K, G236S, L235Y и S267E; (xiv) E272R, L309T, S219Y и S267E; (xv) G236Y; (xvi) G236W; (xvii) F243L, G446E, P396L и S267E; (xviii) G236A, S239D и H268E, причем нумерация аминокислотных остатков осуществляется в соответствии с индексом EU, как описано в Kabat. В определенных вариантах осуществления, полипептид является афукозилированным. В некоторых вариантах осуществления, CH2-CH3 или шарнир-CH3-CH3 или тяжелая цепь IgG1 имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с CH2-CH3 или шарниром-CH2-CH3 или CH1-CH3 IgG1 человека дикого типа, соответственно. В определенных вариантах осуществления, полипептид по настоящему изобретению содержит вариант Fc, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в любом из SEQ ID NO:1-5 и 36-38.

В некоторых вариантах осуществления, предусматривается антитело (описанное далее в данном документе), которое содержит, в тяжелой цепи IgG1 (например, человека), аминокислотную мутацию (мутации), представленные в любом из (i)-(xviii): (i) G236A, L328V и Q295E; (ii) G236A, P230A и Q295E; (iii) G236A, R292P и I377N; (iv) G236A, K334A и Q295E; (v) G236S, R292P и Y300L; (vi) G236A и Y300L; (vii) G236A, R292P и Y300L; (viii) G236S, G420V, G446E и L309T; (ix) G236A и R292P; (x) R292P и Y300L; (xi) G236A и R292P; (xii) Y300L; (xiii) E345K, G236S, L235Y и S267E; (xiv) E272R, L309T, S219Y и S267E; (xv) G236Y; (xvi) G236W; (xvii) F243L, G446E, P396L и S267E; (xviii) G236A, S239D и H268E, причем нумерация аминокислотных остатков осуществляется в соответствии с индексом EU, как описано в Kabat. В определенных вариантах осуществления, полипептид является афукозилированным. В некоторых вариантах

осуществления, полипептид или антитело дополнительно содержат одну или несколько мутаций, которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как мутации M428L и N434S или мутации M428L и N434A (нумерация EU), или любую другую мутацию (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления, полипептид является афукозилированным. В некоторых вариантах осуществления, тяжелая цепь IgG1 содержит CH1-CH3 или CH2-CH3 или шарнир-CH2-CH3, причем указанные CH1-CH3 или CH2-CH3 или шарнир-CH2-CH3 имеют по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с CH1-CH3 или CH2-CH3 или шарниром-CH2-CH3 IgG1 человека дикого типа, соответственно. В определенных вариантах осуществления, антитело по настоящему изобретению содержит вариант Fc, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в любом из SEQ ID NO:1-5 и 36-38.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид или антитело содержат аминокислотную последовательность, представленную в любом из SEQ ID NO:6-23 и 45, или ее вариант, например, дополнительно содержащий одну или несколько мутаций, которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как мутации M428L и N434S или мутации M428L и N434A (нумерация EU) или любую другую мутацию (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, включая описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления, полипептид или антитело содержат аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности, представленной в любом из SEQ ID NO:6-23 и 45, только одной или несколькими мутациями, специфичными для аллотипа IgG1, и/или присутствием мутаций M428L и N434S или мутаций M428L и N434A или другой мутации (мутаций), которые усиливают связывание с FcRn человека.

Полипептид по настоящему изобретению может быть фукозилированным (например, содержащим один или несколько фукозильных фрагментов, и типично содержащим нативный (дикого типа) паттерн фукозилирования или паттерн фукозилирования, который включает один или несколько дополнительных, или меньшее количество, фукозильных фрагментов по сравнению с нативным), или может быть афукозилированным. В частности, нативные антитела IgG1 несут гликановый сайт в положении N297, и обычно это единственный сайт, в котором в антителе может находиться коровый фукозный фрагмент, хотя некоторые гликановые сайты могут возникать в результате мутации (например, в переменных доменах) в процессе формирования антитела. Фукозилирование полипептида Fc или его фрагмента, или антитела, может осуществляться путем введения аминокислотных мутаций с целью введения или разрушения сайта фукозилирования (например, мутации в положении N297, такой как N297Q или N297A, для нарушения формирования гликана, который может включать коровый фукозный фрагмент), хотя обычно предпочтительным будет сохранение N297 и его гликана, например, путем экспрессирования полипептида в клетке-хозяине, которая была генетически модифицирована для потери способности (или имеет ингибированную или нарушенную способность) фукозилировать полипептид; путем экспрессирования полипептида в условиях, при которых способность клетки-хозяина фукозилировать полипептид нарушена (например, в присутствии 2-фтор-L-фукозы (2FF)) и т.п. Афукозилированный полипептид может не содержать фукозных фрагментов, или по существу не содержать фукозных фрагментов, и/или может быть экспрессирован клеткой-хозяином, генетически модифицированной для потери способности (или имеющей ингибированную или нарушенную способность) фукозилировать полипептид, и/или может быть экспрессирован в условиях, при которых способность клетки-хозяина фукозилировать полипептид нарушена (например, в присутствии 2-фтор-L-фукозы (2FF)). В некоторых вариантах осуществления, полипептид не содержит корового фукозного фрагмента в положении Asn297. В некоторых вариантах осуществления, афукозилированные полипептиды имеют повышенное связывание с FcγRIIIA. В некоторых контекстах, добавление 2FF в культуральные среды, содержащие клетки-хозяева, экспрессирующие антитело, приводит к тому, что примерно 85% или больше антител не содержат фукозный фрагмент. Соответственно, множество антител может быть описано как «афукозилированное», если указанное множество продуцировалось в присутствии 2FF или подобного реагента. В некоторых контекстах, множество

полипептидов или антител может быть описано как, например, афукозилированное, что означает, что примерно 85% или больше отдельных молекул множества полипептидов или антител не содержит фукозного фрагмента. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, афукозилированное антитело или полипептид или их популяция или множество содержит аспарагин (N) в положении 297 по EU. Фукозилирование или его отсутствие можно оценить с помощью, например, масс-спектрометрии (например, масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ESI-МС)). В некоторых вариантах осуществления, предусматриваются композиции, которые содержат множество из любого одного или нескольких раскрытых в данном документе полипептидов, причем указанная композиция содержит афукозилированные полипептиды.

Также в Примерах настоящего изобретения, варианты Fc, включая содержащие мутации, указанные в Таблице 1 выше, экспрессировались в афукозилированные антитела IgG1 человека и тестировались на различные свойства, включая сравнение с фукозилированным антителом IgG1 человека дикого типа. См., например, Фиг. 10B; в некоторых контекстах, афукозилированные полипептиды, несущие варианты Fc, имеют аналогичные или даже улучшенные свойства по сравнению с фукозилированными.

В определенных вариантах осуществления, раскрытые в данном документе варианты полипептидов Fc IgG или их фрагменты обладают одной или несколькими функциями, отличными от (например, улучшенными по сравнению с) соответствующей функцией референсного полипептида Fc, который содержит следующую мутацию или мутации: G236A; G236S; G236A\_A330L\_I332E; G236A\_A330L\_I332E\_M428L\_N434S; A330L\_I332E; или G236A\_S239D\_A330L\_I332E. Например, в некоторых вариантах осуществления, раскрытых в данном документе, вариант полипептида Fc IgG или его фрагмент обладает одним или несколькими из следующих свойств, по сравнению с референсным полипептидом Fc, который содержит следующую мутацию или мутации: G236A; G236S; G236A\_A330L\_I332E; G236A\_A330L\_I332E\_M428L\_N434S; A330L\_I332E; или G236A\_S239D\_A330L\_I332E: повышенное связывание (например, аффинность) с и/или сигнализация через H131 FcγRIIa человека; повышенное связывание (например, аффинность) с и/или сигнализация через R131 FcγRIIa человека; пониженное связывание с (например, аффинность) и/или сигнализация через FcγRIIb человека; повышенное соотношение связывания с (например, аффинность) и/или сигнализации через FcγRIIa человека (H131, R131, или оба) по сравнению с соотношением связывания с или сигнализации через (соответственно) FcγRIIb человека; повышенное связывание

(например, аффинность) с и/или сигнализация через FcγRIIIa человека (V158, F158, или оба); повышенное связывание (например, аффинность) с C1q человека; более высокая Tm; улучшенный продуцируемый титр; улучшенная сигнализация в клетке-хозяине через FcγRIIIa (H131, R131, или оба); повышенное содействие АЗКФ и/или АЗКЦТ ЕК-клетками человека и/или МНКПК человека в присутствии антигенпрезентирующих клеток; и улучшенная способность стимулировать моДК в иммунном комплексе с антигеном.

В настоящем изобретении, связывание варианта полипептида Fc или фрагмента может быть описано как повышенное (или «большее чем» и т.п.) или уменьшенное (или «сниженное» или «меньшее чем» и т.п.) по сравнению со связыванием сопоставляемого элемента (например, с Fc референсного IgG1 дикого типа, или с Fc референсного IgG1, соответствующего дикому типу, за исключением мутаций M428L и N434S или за исключением мутаций M428L и N434A, или варианта Fc IgG1, содержащего мутации G236A\_A330L\_I332E), с тем же партнером связывания. Связывающие взаимодействия между вариантом полипептида Fc или фрагментом (или содержащими их антителом или полипептидом) и партнером связывания (например, FcγR, FcRn или C1q человека) могут быть предпочтительно определены с использованием электрохемилюминесцентного анализа, более предпочтительно с использованием платформы Meso Scale Discovery («MSD»; [mesoscale.com](http://mesoscale.com)). Анализ связывания MSD схож с ИФА (ELISA), но MSD использует электрохемилюминесценцию, а не колориметрию, как метод обнаружения. Известны другие методики измерения взаимодействий связывания и включают, например, ИФА, поверхностный плазмонный резонанс (ППР), интерферометрию биослоев (ИБС) и т.п.

В некоторых вариантах осуществления, связывание включает аффинность, авидность, или оба эти показателя. Аффинность относится к прочности связи между связывающей молекулой и ее партнером связывания. В некоторых контекстах, связывание может включать аффинность и/или авидность. Если не указано иное, авидность относится к общей силе связывания молекулы с партнером связывания, и отображает аффинность связывания, валентность сайтов связывания (например, содержит ли полипептид Fc один, два или больше сайтов связывания) и, например, присутствие другого агента, который может повлиять на связывание (например, неконкурентного ингибитора полипептида Fc).

Связывающее взаимодействие между вариантом молекулы по настоящему изобретению и партнером связывания может быть выражено через кратность изменения по сравнению со взаимодействием связывания между референсной молекулой и

партнером связывания. Например, связывание раскрытого в данном документе антителя, содержащего вариант Fc, с FcγRIIIa человека, может быть сильнее связывания антителя, содержащего Fc дикого типа, с FcγRIIIa человека, и относительно повышенная прочность связи для варианта может быть выражена через кратность изменения (например, линейная шкала площади под кривой) по сравнению со связыванием референсной молекулы с использованием этого же анализа. Например, вариант полипептида Fc или фрагмент могут связываться с FcγRIIIa с 2-кратно, 3-кратно, 4-кратно или 5-кратно большей силой связывания, чем при связывании референсного полипептида Fc или фрагмента с FcγRIIIa. В качестве другого примера, вариант полипептида Fc или его фрагмент могут слабее связываться с FcγRIIIb по сравнению с референсным Fc или его фрагментом; например, могут иметь 0,9-кратное связывание, 0,8-кратное связывание, 0,7-кратное связывание, 0,6-кратное связывание и т.п., по сравнению с референсным полипептидом Fc или его фрагментом. Следует понимать, что, например, выражение «2-кратно большее связывание по сравнению со связыванием эталона» означает 2-кратное увеличение связывания по сравнению с эталоном.

Кроме того, связывание варианта молекулы по настоящему изобретению с двумя разными молекулами-партнерами может быть описано как отношение, и это отношение может сравниваться со схожим отношением, полученным с использованием референсной молекулы в этом же анализе. Например, вариант полипептида Fc может связываться с H131 FcγRIIIa человека в пять раз сильнее, чем он связывается с FcγRIIIb человека, в то время как референсный полипептид Fc дикого типа связывается с H131 FcγRIIIa так же сильно, как и с FcγRIIIb человека. В этом примере, можно сказать, что вариант полипептида Fc имеет отношение связывания 5:1 (связывание H131 FcγRIIIa:связывание FcγRIIIb), которое можно сравнивать с отношением связывания 1:1 (связывание H131 FcγRIIIa:связывание FcγRIIIb) для референсного полипептида Fc дикого типа.

Вариант молекулы по настоящему изобретению может также быть описан по способности индуцировать сигнализацию в клетке-хозяине, причем клетка-хозяин экспрессирует или сверхэкспрессирует один или несколько FcγR (например, H131 FcγRIIIa, R131 FcγRIIIa, FcγRIIIb, F158 FcγRIIIa или V158 FcγRIIIa) и сигнализация индуцируется связыванием варианта молекулы с FcγR. Репортерные клетки, пригодные для определения сигнализации, включают, например, клетки, в которых NFAT направляет экспрессию репортера люциферазы (например, поставляется фирмой Promega®).

Если не указано иное, Fc $\gamma$ R, FcRn и C1q, описанные в данном документе, принадлежат человеку.

В некоторых вариантах осуществления, антитело, содержащее вариант полипептида Fc или фрагмент, предпочтительно способно индуцировать что-то одно или несколько из: антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦТ), антитело-зависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ); и комплемент-зависимой цитотоксичности. Анализы для измерения таких функций являются известными.

В некоторых вариантах осуществления, вариант полипептида Fc или фрагмент (или содержащие их полипептид или антитело) предпочтительно имеют сопоставимое связывание с FcRn человека (например, при pH 6,0) и/или сопоставимый *in vivo* период полувыведения у млекопитающего по сравнению с референсным полипептидом Fc, фрагментом, или антителом, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, вариант полипептида Fc или фрагмент (или содержащие их полипептид или антитело) предпочтительно имеют повышенное связывание с FcRn человека (например, при pH 6,0) и/или повышенный *in vivo* период полувыведения у млекопитающего по сравнению с референсным полипептидом Fc, фрагментом, или антителом, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, вариант полипептида Fc или фрагмент (или содержащие их полипептид или антитело) предпочтительно имеют температуру плавления ( $T_m$ ), которая менее чем на 12 °C, менее чем на 11 °C, менее чем на 10 °C, менее чем на 9 °C, менее чем на 8 °C, менее чем на 7 °C, менее чем на 6 °C, менее чем на 5 °C, менее чем на 4 °C, менее чем на 3 °C, менее чем на 2 °C, или менее чем на 1 °C ниже  $T_m$  референсного полипептида Fc или фрагмента (или содержащих их полипептида или антитела), или имеют  $T_m$ , которая выше  $T_m$  референсного полипептида Fc или фрагмента (или содержащих их полипептида или антитела). В некоторых вариантах осуществления, референсный полипептид или фрагмент представляет собой или содержит полипептид Fc человека дикого типа (или содержащее его антитело).

В некоторых вариантах осуществления, вариант полипептида Fc или фрагмент (или содержащие их полипептид или антитело) имеют температуру плавления, которая выше температуры плавления референсного полипептида Fc или фрагмента (или содержащих их полипептида или антитела), которые содержат мутации G236A, A330L, I332E и, необязательно, M428L и N434S,

В некоторых вариантах осуществления, вариант полипептида Fc или фрагмент (или содержащие их полипептид или антитело) предпочтительно способен продуцироваться в клеточной линии хозяина (например, клеточной линии CHO) по меньшей мере примерно так же эффективно (например, продуцирует по меньшей мере примерно такой же титр и/или отличающийся от него в меньшую сторону менее чем 0,1-кратно, менее чем 0,09-кратно, менее чем 0,08-кратно, менее чем 0,07-кратно, менее чем 0,06-кратно, менее чем 0,05-кратно, менее чем 0,04-кратно, менее чем 0,03-кратно, менее чем 0,02-кратно, или менее чем 0,02-кратно) по сравнению с референсным полипептидом Fc или фрагментом (или содержащими их полипептидом или антителом).

В определенных вариантах осуществления, предусматривается полипептид, который содержит вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмента, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, валин (V) в положении 328 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 295 по EU. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Fc IgG или его фрагмент содержит (например, в остальном дикого типа) полипептид Fc IgG1 или его фрагмент («GALVQE»). В некоторых вариантах осуществления, полипептид дополнительно содержит мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любую другую мутацию (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления, полипептид является афукозилированным.

В некоторых других вариантах осуществления, предусматривается полипептид, который содержит вариант: (i) полипептида шарнир-CH2 IgG; или (ii) полипептида шарнир-Fc IgG или его фрагмента, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, аланин (A) в положении 230 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 295 по EU. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Fc IgG или его фрагмент содержит (например, в остальном дикого типа) полипептид Fc IgG1 или его фрагмент («GAPAQE»). В некоторых вариантах осуществления, полипептид дополнительно содержит мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любую другую мутацию (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления, полипептид является афукозилированным.

В некоторых других вариантах осуществления, предусматривается полипептид, который содержит вариант: полипептида Fc IgG или его фрагмента, причем указанный

вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, пролин (P) в положении 292 по EU и аспарагин (N) в положении 377 по EU. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Fc IgG или его фрагмент содержит (например, в остальном дикого типа) полипептид Fc IgG1 или его фрагмент («GARPIN»). В некоторых вариантах осуществления, полипептид дополнительно содержит мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любую другую мутацию (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления, полипептид является афукозилированным.

В некоторых других вариантах осуществления, предусматривается полипептид, который содержит полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмента, причем вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, аланин (A) в положении 334 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 295 по EU. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Fc IgG или его фрагмент содержит (например, в остальном дикого типа) полипептид Fc IgG1 или его фрагмент («GAKAQE»). В некоторых вариантах осуществления, полипептид дополнительно содержит мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любую другую мутацию (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления, полипептид является афукозилированным.

В некоторых других вариантах осуществления, предусматривается полипептид, который содержит вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмента, причем указанный вариант содержит серин (S) в положении 236 по EU, пролин (P) в положении 292 по EU и лейцин (L) в положении 300 по EU. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Fc IgG или его фрагмент содержит (например, в остальном дикого типа) полипептид Fc IgG1 или его фрагмент («GSRPYL»). В некоторых вариантах осуществления, полипептид дополнительно содержит мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любую другую мутацию (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления, полипептид является афукозилированным.

В некоторых других вариантах осуществления, предусматривается полипептид, который содержит вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмента, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, пролин (P) в положении 292 по EU и лейцин (L) в положении 300 по EU. В некоторых

вариантах осуществления, полипептид Fc IgG или его фрагмент содержит (например, в остальном дикого типа) полипептид Fc IgG1 или его фрагмент («GARPYL»). В некоторых вариантах осуществления, полипептид дополнительно содержит мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любую другую мутацию (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления, полипептид является афукозилированным.

В некоторых других вариантах осуществления, предусматривается полипептид, который содержит вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмента, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU и лейцин (L) в положении 300 по EU. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Fc IgG или его фрагмент содержит (например, в остальном дикого типа) полипептид Fc IgG1 или его фрагмент («GAYL»). В некоторых вариантах осуществления, полипептид дополнительно содержит мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любую другую мутацию (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления, полипептид является афукозилированным.

В некоторых других вариантах осуществления, предусматривается полипептид, который содержит вариант: (i) полипептида CH2 IgG; или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмента, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, аспарагиновую кислоту (D) в положении 239 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении по EU 268. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Fc IgG или его фрагмент содержит (например, в остальном дикого типа) полипептид Fc IgG1 или его фрагмент («GASDHE»). В некоторых вариантах осуществления, полипептид дополнительно содержит мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любую другую мутацию (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления, полипептид является афукозилированным.

В некоторых вариантах осуществления, указанный вариант и, необязательно, полипептид (например, антитело или продукт слияния с Fc, содержащий вариант), имеет повышенное связывание с FcγRIIIa человека и/или имеет пониженное связывание с FcγRIIb человека, по сравнению со связыванием референсного полипептида с FcγRIIIa человека или FcγRIIb человека, соответственно, причем, необязательно, связывание определяют с

использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

В определенных вариантах осуществления, повышенное связывание с Fc $\gamma$ RIIa человека включает более чем 1-кратно, по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 3-кратно, по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, или по меньшей мере 10-кратно увеличенное связывание с Fc $\gamma$ RIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида (необязательно содержащего полипептид Fc IgG (например, IgG1) человека дикого типа или его фрагмент) с Fc $\gamma$ RIIa человека.

В некоторых вариантах осуществления, Fc $\gamma$ RIIa человека содержит H131 и, необязательно, повышенное связывание с H131 Fc $\gamma$ RIIa человека включает по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, или по меньшей мере 10-кратно большее связывание с H131 Fc $\gamma$ RIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида (необязательно содержащего полипептид Fc IgG (например, IgG1) человека дикого типа или его фрагмент) с H131 Fc $\gamma$ RIIa человека.

В некоторых вариантах осуществления, Fc $\gamma$ RIIa человека содержит R131 и, необязательно, повышенное связывание с R131 Fc $\gamma$ RIIa человека включает более чем 1-кратно, по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 3-кратно, по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, или по меньшей мере 10-кратно увеличенное связывание с R131 Fc $\gamma$ RIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида (необязательно содержащего полипептид Fc IgG (например, IgG1) человека дикого типа или его фрагмент) с R131 Fc $\gamma$ RIIa человека.

В некоторых вариантах осуществления, пониженное связывание с Fc $\gamma$ RIIb человека включает менее чем 0,9-кратное, менее чем 0,8-кратное, менее чем 0,7-кратное, менее чем 0,6-кратное, или между 0,5-кратным и 0,9-кратным, связывание референсного полипептида (необязательно содержащего полипептид Fc IgG (например, IgG1) человека дикого типа или его фрагмент) с Fc $\gamma$ RIIb человека.

В любых из раскрытых в данном документе вариантах осуществления, (1) отношение (i) связывания варианта или полипептида с Fc $\gamma$ RIIa человека к (ii) связыванию варианта или полипептида, соответственно, с Fc $\gamma$ RIIb человека, является большим, чем (2) отношение (iii) связывания референсного полипептида с Fc $\gamma$ RIIa человека к (iv)

связыванию референсного полипептида с Fc $\gamma$ RIIb человека, причем референсный полипептид необязательно содержит полипептид Fc IgG (например, IgG1) человека дикого типа или его фрагмент, при этом, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery. В некоторых вариантах осуществления, Fc $\gamma$ RIIa человека содержит H131, R131, или оба. В некоторых вариантах осуществления, отношение (1) является более чем 1-кратно, по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 3-кратно, по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, по меньшей мере 10-кратно, по меньшей мере 11-кратно, по меньшей мере 12-кратно, по меньшей мере 13-кратно, или по меньшей мере 14-кратно большим, чем отношение (2).

Также предусматривается полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмента, причем вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU и лейцин (L) в положении 300 по EU. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Fc IgG или его фрагмент содержит (например, в остальном дикого типа) полипептид Fc IgG1 или его фрагмент («GAYL»). В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любая другая мутация (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления, полипептид является афукозилированным.

В некоторых вариантах осуществления, указанный вариант и, необязательно, полипептид, имеет повышенное связывание с Fc $\gamma$ RIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида с Fc $\gamma$ RIIa человека, причем, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

В некоторых вариантах осуществления, повышенное связывание с Fc $\gamma$ RIIa человека включает по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, по меньшей мере 10-кратно, по меньшей мере 11-кратно, по меньшей мере 12-кратно, по меньшей мере 13-кратно, по меньшей мере 14-кратно, по меньшей мере 15-кратно, по меньшей мере 16-кратно, по меньшей мере 17-кратно, или по меньшей мере 18-кратно увеличенное связывание с Fc $\gamma$ RIIa человека по сравнению со связыванием

референсного полипептида (необязательно содержащего полипептид Fc IgG (например, IgG1) человека дикого типа или его фрагмент) с FcγRIIa человека.

В некоторых вариантах осуществления, FcγRIIa человека содержит H131 и, необязательно, повышенное связывание с H131 FcγRIIa человека включает по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, или по меньшей мере 10-кратно, по меньшей мере 11-кратно, по меньшей мере 12-кратно, по меньшей мере 13-кратно, по меньшей мере 14-кратно, по меньшей мере 15-кратно, по меньшей мере 16-кратно, по меньшей мере 17-кратно, или по меньшей мере 18-кратно увеличенное связывание с H131 FcγRIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида (необязательно содержащего полипептид Fc IgG (например, IgG1) человека дикого типа или его фрагмент) с H131 FcγRIIa человека.

В некоторых вариантах осуществления, FcγRIIa человека содержит R131 и, необязательно, повышенное связывание с R131 FcγRIIa человека включает по меньшей мере 4-кратно увеличенное связывание с R131 FcγRIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида (необязательно содержащего полипептид Fc IgG (например, IgG1) человека дикого типа или его фрагмент) с R131 FcγRIIa человека.

В определенных вариантах осуществления, (1) отношение (i) связывания варианта или полипептида с FcγRIIa человека к (ii) связыванию варианта или полипептида, соответственно, с FcγRIIb человека, является большим, чем (2) отношение (iii) связывания референсного полипептида с FcγRIIa человека к (iv) связыванию референсного полипептида с FcγRIIb человека, причем референсный полипептид содержит полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент. В определенных вариантах осуществления, FcγRIIa человека содержит H131, R131, или оба. В дополнительных вариантах осуществления, отношение (1) является по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, по меньшей мере 10-кратно, по меньшей мере 11-кратно, по меньшей мере 12-кратно, по меньшей мере 13-кратно, по меньшей мере 14-кратно, по меньшей мере 15-кратно, по меньшей мере 16-кратно, или по меньшей мере 17-кратно большим, чем отношение (2).

Также предусматривается полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмента, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, пролин (P) в положении 292 по EU и лейцин (L) в

положении 300 по EU. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Fc IgG или его фрагмент содержит (например, в остальном дикого типа) полипептид Fc IgG1 или его фрагмент («GARPYL»). В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любая другая мутация (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления, полипептид является афукозилированным.

В определенных вариантах осуществления, указанный вариант и, необязательно, полипептид, имеет повышенное связывание с FcγRIIIa человека, по сравнению со связыванием референсного полипептида с FcγRIIIa человека, причем, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

В некоторых вариантах осуществления, повышенное связывание с FcγRIIIa человека включает по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 3-кратно, по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, по меньшей мере 10-кратно, по меньшей мере 11-кратно, по меньшей мере 12-кратно, по меньшей мере 13-кратно, или по меньшей мере 14-кратно увеличенное связывание с FcγRIIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида, необязательно содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с FcγRIIIa человека.

В некоторых вариантах осуществления, FcγRIIIa человека содержит H131 и, необязательно, повышенное связывание с H131 FcγRIIIa человека включает по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 3-кратно, по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, по меньшей мере 10-кратно, по меньшей мере 11-кратно, по меньшей мере 12-кратно, по меньшей мере 13-кратно, или по меньшей мере 14-кратно увеличенное связывание с H131 FcγRIIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида, необязательно содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с H131 FcγRIIIa человека.

В некоторых вариантах осуществления, FcγRIIIa человека содержит R131 и, необязательно, повышенное связывание с H131 FcγRIIIa человека включает по меньшей мере 2-кратно увеличенное связывание с R131 FcγRIIIa человека по сравнению со

связыванием референсного полипептида, необязательно содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с R131 FcγRIIIa человека.

В определенных вариантах осуществления, (1) отношение (i) связывания варианта или полипептида с FcγRIIIa человека к (ii) связыванию варианта или полипептида, соответственно, с FcγRIIIb человека является большим, чем (2) отношение (iii) связывания референсного полипептида с FcγRIIIa человека к (iv) связыванию референсного полипептида с FcγRIIIb человека, причем референсный полипептид необязательно содержит полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, при этом, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery. В некоторых вариантах осуществления, FcγRIIIa человека содержит H131, R131, или оба. В некоторых вариантах осуществления, отношение (1) является по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 3-кратно, по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, по меньшей мере 10-кратно, по меньшей мере 11-кратно, по меньшей мере 12-кратно, по меньшей мере 13-кратно, по меньшей мере 14-кратно, или по меньшей мере 15-кратно большим, чем отношение (2).

В определенных вариантах осуществления, вариант имеет повышенное связывание с FcγRIIIa человека, по сравнению со связыванием референсного полипептида с FcγRIIIa человека, причем, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery. В некоторых вариантах осуществления, FcγRIII человека содержит V158, F158, или оба. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, повышенное связывание с FcγRIIIa человека включает более чем 2-кратно, по меньшей мере 2,1-кратно, по меньшей мере 2,2-кратно, по меньшей мере 2,3-кратно, по меньшей мере 2,4-кратно, по меньшей мере 2,5-кратно, по меньшей мере 2,6-кратно, по меньшей мере 2,7-кратно, по меньшей мере 2,8-кратно, по меньшей мере 2,9-кратно, по меньшей мере 3,0-кратно, по меньшей мере 3,1-кратно, по меньшей мере 3,2-кратно, по меньшей мере 3,3-кратно, по меньшей мере 3,4-кратно, по меньшей мере 3,5-кратно, по меньшей мере 3,6-кратно, или по меньшей мере 3,7-кратно увеличенное связывание с FcγRIIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида, необязательно содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с FcγRIIIa человека.

В определенных вариантах осуществления, указанный вариант и, необязательно, полипептид, способен связываться с компонентом 1q (C1q) комплемента человека, причем, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

Также предусматривается полипептид, который содержит вариант полипептида Fc IgG, причем указанный вариант содержит серин (S) в положении 236 по EU, валин (V) в положении 420 по EU, глутаминовую кислоту (E) в положении 446 по EU и треонин (T) в положении 309 по EU. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Fc IgG или его фрагмент содержит (например, в остальном дикого типа) полипептид Fc IgG1 или его фрагмент («GSGVGELT»). В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любая другая мутация (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления, полипептид является афукозилированным.

Также предусматривается полипептид, который содержит вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU и пролин (P) в положении 292 по EU. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Fc IgG или его фрагмент содержит (например, иначе дикого типа) полипептид Fc IgG1 или его фрагмент («GARP»). В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любая другая мутация (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления, полипептид является афукозилированным.

В определенных вариантах осуществления, указанный вариант и, необязательно, полипептид, имеет пониженное связывание с FcγRIIb человека по сравнению со связыванием референсного полипептида с FcγRIIb человека, причем, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery. В некоторых вариантах осуществления, пониженное связывание с FcγRIIb человека включает менее чем 0,9-кратное, менее чем 0,8-кратное, менее чем 0,7-кратное, менее чем 0,6-кратное, менее чем 0,5-кратное, или менее 0,4-кратное по сравнению со связыванием референсного

полипептида, необязательно содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с Fc $\gamma$ RIIIb человека.

В дополнительных вариантах осуществления, указанный вариант и, необязательно, полипептид, имеет повышенное связывание с Fc $\gamma$ RIIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида с Fc $\gamma$ RIIIa человека, причем, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

В некоторых вариантах осуществления, повышенное связывание с Fc $\gamma$ RIIIa человека включает более чем 1-кратно, по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 3-кратно, по меньшей мере 4-кратно, или по меньшей мере 5-кратно увеличенное связывание с Fc $\gamma$ RIIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с Fc $\gamma$ RIIIa человека.

В определенных вариантах осуществления, Fc $\gamma$ RIIIa человека содержит H131, R131, или оба.

В некоторых вариантах осуществления, (1) отношение (i) связывания варианта или полипептида с Fc $\gamma$ RIIIa человека к (ii) связыванию варианта или полипептида, соответственно, с Fc $\gamma$ RIIIb человека является большим, чем (2) отношение (iii) связывания референсного полипептида с Fc $\gamma$ RIIIa человека к (iv) связыванию референсного полипептида с Fc $\gamma$ RIIIb человека, причем референсный полипептид необязательно содержит полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, при этом, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery. В некоторых вариантах осуществления, Fc $\gamma$ RIIIa человека содержит H131, R131, или оба. В определенных вариантах осуществления, отношение (1) является по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 3-кратно, по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 10-кратно, по меньшей мере 11-кратно, или по меньшей мере 12-кратно большим, чем отношение (2).

Также предусматривается полипептид, который содержит вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG, причем указанный вариант содержит пролин (P) в положении 292 по EU и лейцин (L) в положении 300 по EU, и при этом, необязательно, вариант и, дополнительно необязательно, полипептид имеет повышенное связывание с

FcγRIIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида с FcγRIIIa человека, причем, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery. В некоторых вариантах осуществления, полипептид CH2 IgG или полипептид Fc IgG содержит (например, в остальном дикого типа) полипептид CH2 IgG1 или полипептид Fc IgG («RPYL»). В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любая другая мутация (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления, полипептид является афукозилированным.

В определенных вариантах осуществления, FcγRIIIa человека содержит V158, F158, или оба, и при этом повышенное связывание с FcγRIIIa человека включает по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 4,5-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 5,1-кратно, или по меньшей мере 5,2-кратно увеличенное связывание по сравнению со связыванием референсного полипептида, необязательно содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с FcγRIIIa человека.

Также предусматривается полипептид, который содержит вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмента, причем указанный вариант содержит лейцин (L) в положении 300 по EU. В некоторых вариантах осуществления, полипептид CH2 IgG или полипептид Fc IgG или его фрагмент содержит (например, в остальном дикого типа) полипептид Fc IgG1 или его фрагмент («YL»). В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любая другая мутация (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления, полипептид является афукозилированным.

Также предусматривается полипептид, который содержит вариант: полипептида Fc IgG или его фрагмент, причем указанный вариант содержит лизин (K) в положении 345 по EU, серин (S) в положении 236 по EU, тирозин (Y) в положении 235 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 267 по EU. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Fc IgG или его фрагмент содержит (например, в остальном дикого типа) полипептид Fc IgG1 или его фрагмент («GSEKLYSE»). В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любая другая мутация (мутации), которые усиливают

связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления, полипептид является афукозилированным.

Также предусматривается полипептид, который содержит вариант: (i) полипептида шарнир-CH2 IgG или (ii) полипептида шарнир-Fc IgG или его фрагмента, причем указанный вариант содержит аргинин (R) в положении 272 по EU, треонин (T) в положении 309 по EU, тирозин (Y) в положении 219 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 267 по EU. В некоторых вариантах осуществления, указанный полипептид шарнир-CH2 IgG или полипептид шарнир-Fc IgG или его фрагмент содержит (например, в остальном дикого типа) полипептид шарнир-CH2 IgG1 или полипептид шарнир-Fc IgG или его фрагмент («SYSEERLT»). В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любая другая мутация (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления, полипептид является афукозилированным.

Также предусматривается полипептид, который содержит вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмент, причем указанный вариант содержит тирозин (Y) в положении 236 по EU. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Fc IgG или его фрагмент содержит (например, иначе дикого типа) полипептид Fc IgG1 или его фрагмент («GY»). В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любая другая мутация (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления, полипептид является афукозилированным.

Также предусматривается полипептид, который содержит вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмента, причем указанный вариант содержит триптофан (W) в положении 236 по EU. В некоторых вариантах осуществления, указанный полипептид CH2 IgG или (ii) полипептид Fc IgG или его фрагмент содержит (например, в остальном дикого типа) полипептид CH2 IgG1 или полипептид Fc или его фрагмент («GW»). В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любая другая мутация (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления, полипептид является афукозилированным.

Также предусматривается полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмента, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, при этом полипептид Fc IgG или его фрагмент и, необязательно, полипептид, является афукозилированным, и при этом, дополнительно необязательно, вариант содержит лейцин (L) в положении 330 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 332 по EU, при этом, еще дополнительно необязательно, вариант не содержит аспарагиновую кислоту (D) в положении 239 по EU и, еще дополнительно необязательно, содержит серин (S) в положении 239 по EU. В некоторых вариантах осуществления, полипептид CH2 IgG или (ii) полипептид Fc IgG или его фрагмент содержит (например, в остальном дикого типа) полипептид CH2 IgG1 или полипептид Fc или его фрагмент («GA-afuc» или «GAALIE-afuc», соответственно). В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любая другая мутация (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе.

Также предусматривается полипептид, который содержит вариант: полипептида Fc IgG или его фрагмента, причем указанный вариант содержит лейцин (L) в положении 243 по EU, глутаминовую кислоту (E) в положении 446 по EU, лейцин (L) в положении 396 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 267 по EU. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Fc IgG или его фрагмент содержит (например, в остальном дикого типа) полипептид Fc IgG1 или его фрагмент («FLSEPLGE»). В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любая другая мутация (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления, полипептид является афукозилированным.

Также предусматривается полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмента, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, аспарагиновую кислоту (D) в положении 239 по EU, глутаминовую кислоту (E) в положении 332 по EU, лейцин (L) в положении 428 по EU, и серин (S) или аланин (A) в положении 434 по EU. В некоторых вариантах осуществления, полипептид Fc IgG или его фрагмент содержит (например, в остальном дикого типа) полипептид Fc IgG1 или его фрагмент («GASDIEMLNS» или «GASDIEMLNA»). В определенных вариантах осуществления, полипептид имеет повышенное связывание с C1q человека по сравнению со связыванием референсного полипептида с C1q человека,

причем, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery. В некоторых вариантах осуществления, повышенное связывание с C1q человека включает более чем 1-кратно, по меньшей мере 1,5-кратно, по меньшей мере 1,75-кратно, по меньшей мере 1,9-кратно, по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 2,1-кратно, по меньшей мере 2,2-кратно, по меньшей мере 2,3-кратно, по меньшей мере 2,4-кратно, по меньшей мере 2,5-кратно, по меньшей мере 2,6-кратно, по меньшей мере 2,7-кратно, по меньшей мере 2,8-кратно, по меньшей мере 2,9-кратно, по меньшей мере 3,0-кратно, по меньшей мере 3,1-кратно, по меньшей мере 3,2-кратно, по меньшей мере 3,3-кратно, по меньшей мере 3,4-кратно, по меньшей мере 3,5-кратно, по меньшей мере 3,6-кратно, по меньшей мере 3,7-кратно, по меньшей мере 3,8-кратно, по меньшей мере 3,9-кратно, по меньшей мере 4,0-кратно, по меньшей мере 4,1-кратно, или по меньшей мере 4,15-кратно увеличенное связывание с C1q человека по сравнению со связыванием референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с C1q человека.

В некоторых раскрытых в данном документе вариантах осуществления, полипептид: (i) способен связываться с FcγRIIIa человека, причем FcγRIIIa человека содержит V158, F158, или оба; (ii) способен связываться с FcγRIIIb человека; (iii) способен связываться с FcRn человека, необязательно при pH 6; (iv) способен связываться с компонентом Iq (C1q) комплемента человека; (v) имеет более высокую Tm и/или может продуцироваться с более высоким титром по сравнению с (1) референсным полипептидом, содержащим полипептид Fc IgG1 человека, содержащий аминокислотные замены G236A, S239D, A330L и I330E (нумерация EU) и, необязательно, не содержащий каких-либо других аминокислотных замен по сравнению с полипептидом Fc IgG1 человека дикого типа, (2) референсным полипептидом, содержащим полипептид Fc IgG1 человека, содержащий аминокислотные замены G236A, A330L и I330E (нумерация EU) и, необязательно, дополнительно содержащий мутации M428L и N434S и/или мутации M428L и N434A и/или не содержащий каких-либо других аминокислотных замен и/или не содержащий S239D, по сравнению с полипептидом Fc IgG1 человека дикого типа, (3) референсным полипептидом, содержащим полипептид Fc IgG1 человека, содержащий аминокислотную замену G236A или G236S (нумерация EU) и, необязательно, не содержащий каких-либо других аминокислотных замен по сравнению с полипептидом Fc IgG1 человека дикого типа, и/или (4) референсным полипептидом, содержащим

полипептид Fc IgG1 человека, содержащий аминокислотные замены A330L и I332E (нумерация EU) и, необязательно, не содержащий каких-либо других аминокислотных замен по сравнению с полипептидом Fc IgG1 человека дикого типа; (vi) способен стимулировать сигнализацию через FcγRa в клетке-хозяине, причем, необязательно, (a) сигнализация необязательно является повышенной по сравнению с сигнализацией, стимулируемой референсным полипептидом и/или (b) FcγRa включает H131 FcγRIIa, R131 FcγRIIa, V158 FcγRIIa, F158 FcγRIIa, или любую их комбинацию; (vii) по меньшей мере в составе антитела способен стимулировать антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦТ); (viii) по меньшей мере в составе антитела способен стимулировать антитело-зависимый фагоцитоз (АЗКФ); (ix) по меньшей мере в составе антитела способен стимулировать комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ); (x) по меньшей мере в составе антитела способен образовывать иммунный комплекс; или (xi) любая комбинация (i)-(x).

В любых из раскрытых в данном документе вариантах осуществления, вариант может дополнительно содержать одну или несколько модификаций, которые усиливают или дополнительно усиливают связывание с FcRn человека по сравнению с (1) референсным полипептидом, который содержит полипептид Fc IgG1 человека дикого типа и/или с (2) полипептидом без одной или нескольких модификаций. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько модификаций, которые усиливают связывание с FcRn человека, содержит аминокислотные замены: (i) M428L/N434S; (ii) M252Y/S254T/T256E; (iii) T250Q/M428L; (iv) P257I/Q311I; (v) P257I/N434H; (vi) D376V/N434H; (vii) T307A/E380A/N434A; (viii) M428L/N434A; или (ix) любую комбинацию (i)-(viii).

В любых из раскрытых в данном документе вариантах осуществления, вариант может не содержать каких-либо дополнительных мутаций по сравнению с референсным полипептидом Fc IgG или его фрагментом, полипептидом шарнир-CH2 IgG, или полипептидом шарнир-Fc IgG или его фрагментом, соответственно. В других вариантах осуществления, вариант полипептида Fc IgG содержит, не более чем: 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 дополнительную аминокислотную замену (замен) по сравнению с дикого типа или исходным полипептидом Fc IgG, причем одна или несколько дополнительная аминокислотная замена (замены) необязательно содержит консервативную аминокислотную замену. В других вариантах осуществления, вариант полипептида Fc IgG имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере

87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96% или по меньшей мере 97% идентичности с дикого типа или исходным полипептидом Fc IgG.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид содержит полипептид Fc.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид представляет собой мономер, состоящий из димера полипептида (например, димера Fc). В некоторых вариантах осуществления, полипептид представляет собой мономер, состоящий из гомодимера полипептида (например, гомодимера Fc). В некоторых вариантах осуществления, полипептид представляет собой мономер, состоящий из гетеродимера полипептида (например, гетеродимера Fc, необязательно содержащего выступ в первом Fc гетеродимера и соответствующую полость во втором Fc гетеродимера, и/или содержащий одну или несколько мутаций, которые обеспечивают или создают противоположный заряд в каждом из двух мономеров Fc (например, положительный заряд в области первого мономера и отрицательный заряд в соответствующей области второго мономера), и/или содержащий гетерологичную аминокислотную последовательность в одном или обоих мономерах, для стимулирования димеризации двух мономеров Fc).

В некоторых вариантах осуществления, вариант полипептида Fc или фрагмент входит в состав антитела. Также предусматриваются антитела, которые содержат любые из раскрытых в данном документе вариантов полипептида Fc или фрагмента по настоящему изобретению. Термины, понятные специалистам в области технологии антител, имеют значения, принятые в данной области, если в данном документе прямо не определено иное. Например, термин «антитело» относится к интактному антителу, содержащему по меньшей мере две тяжелых (H) цепи и две легких (L) цепи, соединенных между собой дисульфидными связями, а также любую антигенсвязывающую часть или фрагмент интактного антитела, которая имеет или сохраняет способность связываться с молекулой-мишенью антигена, распознаваемой интактным антителом, такие как scFv, Fab, или фрагмент Fab'2, при условии, что вариант полипептида Fc или фрагмент, предусматриваемый в данном документе, входит в состав антитела. Таким образом, термин «антитело» в данном документе используется в самом широком смысле и включает поликлональные и моноклональные антитела, включая интактные антитела, а также их функциональные (антигенсвязывающие) фрагменты антител, которые содержат полипептид Fc или фрагмент; например, которые содержат полипептид Fc и фрагмент

антигенсвязывающего (Fab) фрагмента, фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, фрагмент Fab', фрагмент Fv, фрагмент рекомбинантного IgG (rIgG), фрагмент одноцепочечного антитела, включая фрагменты одноцепочечных вариабельных фрагментов (scFv) и однодоменного антитела (например, sdAb, sdFv, нанотела); например, предусматриваемые варианты осуществления включают, без ограничений, интактные антитела; продукты слияния scFv:Fc, продукты слияния scFab:, продукты слияния sdAb:Fc, продукты слияния sdFv:Fc, три-Fab, DART-Fc, DVD-Ig, ди-диатела, scFv-Fc, taFv-Fc, продукты слияния scFv-CH<sub>3</sub>, продукты слияния scFv-CH<sub>2</sub>, антитела на основе пар заряженных CH<sub>3</sub>, дуотела, полуантитела, IgG (HA-Tf-Fv) и т.п. Термин охватывает генно-инженерные и/или иначе модифицированные формы иммуноглобулинов, такие как интратела, пептитела, химерные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела и гетероконъюгаты антител, мультиспецифические, например, биспецифические антитела, диатела, триатела, тетратела, тандемные ди-scFv и тандемные три-scFv (при условии присутствия раскрытого в данном документе варианта полипептида Fc или его фрагмента). Если не указано иное, термин «антитело» следует понимать как охватывающий его функциональные фрагменты антитела, при условии присутствия раскрытого в данном документе варианта полипептида Fc или его фрагмента. Термин также охватывает интактные или полноразмерные антитела, включая антитела любого класса или подкласса, включая IgG и его подклассы (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgE, IgA, и IgD.

Термины «V<sub>L</sub>» или «VL» и «V<sub>H</sub>» или «VH» относятся к вариабельной связывающей области из легкой цепи антитела и тяжелой цепи антитела, соответственно. В определенных вариантах осуществления, VL относится к классу каппа (κ) (также «VK» в данном документе). В определенных вариантах осуществления, VL относится к классу лямбда (λ). Вариабельные связывающие области включают дискретные, четко определенные подобласти, известные как «участки, определяющие комплементарность» (CDR) и «каркасные участки» (FR). Термины «участок, определяющий комплементарность», и «CDR», являются синонимичными с «гипервариабельной областью» или «HVR», и относятся к последовательности аминокислот внутри вариабельных областей антитела, которые, в общем, вместе придают антигену специфичность и/или аффинность связывания антитела, причем последовательные CDR (*m.e.*, CDR1 и CDR2, CDR2 и CDR3) отделены друг от друга в первичной структуре каркасным участком. В каждой вариабельной области присутствует три CDR (HCDR1, HCDR2, HCDR3; LCDR1, LCDR2, LCDR3; также называемые CDRH и CDRL,

соответственно). В определенных вариантах осуществления, антитело VH содержит четыре FR и три CDR, следующим образом: FR1-HCDR1-FR2-HCDR2-FR3-HCDR3-FR4; и антитело VL содержит четыре FR и три CDR, следующим образом: FR1-LCDR1-FR2-LCDR2-FR3-LCDR3-FR4. В общем, VH и VL вместе образуют антигенсвязывающий сайт посредством своих соответствующих CDR. Нумерация CDR и каркасных участков может соответствовать любому известному способу или схеме, таким как схемы нумерации Kabat, Chothia, EU, IMGT и АНО (см., например, Kabat *et al.*, «Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5<sup>th</sup> ed.; Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)); Lefranc *et al.*, *Dev. Comp. Immunol.* 27:55, 2003; Honegger and Plückthun, *J. Mol. Bio.* 309:657-670 (2001)).

В определенных вариантах осуществления, полипептид или антитело по настоящему изобретению содержит антигенсвязывающий домен, содержащий VH и VL. В некоторых вариантах осуществления, VH и VL содержат или состоят из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: (i) 26 и 27, соответственно; (ii) 28 и 29, соответственно; (iii) 30 и 31, соответственно; (iv) 30 и 33, соответственно; (v) 32 и 31, соответственно; (vi) 32 и 33, соответственно; (vii) 34 и 35, соответственно; (viii) 43 и 44, соответственно; (ix) 32 и 46, соответственно; (x) 41 и 42, соответственно; или (xi) 47 и 48, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, полипептид или антитело дополнительно содержит константный домен легкой цепи каппа или константный домен легкой цепи лямбда. В некоторых вариантах осуществления, полипептид или антитело дополнительно содержит CH1.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид или антитело по настоящему изобретению содержит антигенсвязывающий домен, содержащий VH и VL, причем указанные VH и VL содержат или состоят из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 28 и 29, соответственно, и полипептид или антитело дополнительно содержит вариант (например, IgG1) полипептида Fc IgG, при этом указанный вариант содержит следующие мутации, согласно нумерации EU: (i) M428L, N434S, G236A, L328V и Q295E; (ii) M428L, N434S, G236A, R292P и I377N; (iii) M428L, N434S, G236A и Y300L; (iv) M428L, N434S, G236A, R292P и Y300L; (v) M428L, N434S, G236A, L328V и Q295E, причем полипептид или антитело является афукозилированным; (vi) M428L, N434S, G236A, R292P и I377N, причем полипептид или антитело является афукозилированным; (vii) M428L, N434S, G236A и Y300L, причем полипептид или

антитело является афукозилированным; или (viii) M428L, N434S, G236A, R292P и Y300L, причем полипептид или антитело является афукозилированным. В некоторых вариантах осуществления, вариант (например, IgG1) полипептида Fc IgG содержит аминокислотные замены, которые состоят по существу из мутаций замены, указанных в (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii) или (viii) выше. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит легкую цепь каппа.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид или антитело по настоящему изобретению содержит антигенсвязывающий домен, содержащий VH и VL, причем указанные VH и VL содержат или состоят из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:43 и 44, соответственно, и полипептид или антитело дополнительно содержит вариант (например, IgG1) полипептида Fc IgG, при этом указанный вариант содержит следующие мутации, согласно нумерации EU: (i) M428L, N434A, G236A, L328V и Q295E; (ii) M428L, N434A, G236A, R292P и I377N; (iii) M428L, N434A, G236A и Y300L; (iv) M428L, N434A, G236A, R292P и Y300L; (v) M428L, N434A, G236A, L328V и Q295E, причем полипептид или антитело является афукозилированным; (vi) M428L, N434A, G236A, R292P и I377N, причем полипептид или антитело является афукозилированным; (vii) M428L, N434A, G236A и Y300L, причем полипептид или антитело является афукозилированным; или (viii) M428L, N434A, G236A, R292P и Y300L, причем полипептид или антитело является афукозилированным. В некоторых вариантах осуществления, вариант полипептида Fc IgG содержит аминокислотные замены, которые состоят по существу из мутаций замены, указанных в (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii) или (viii) выше. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит легкую цепь каппа.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид или антитело по настоящему изобретению содержит антигенсвязывающий домен, содержащий VH и VL, причем указанные VH и VL содержат или состоят из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:43 и 44, соответственно, и полипептид или антитело дополнительно содержит вариант (например, IgG1) полипептида Fc IgG, при этом указанный вариант содержит следующие мутации, согласно нумерации EU: (i) M428L, N434S, G236A, L328V и Q295E; (ii) M428L, N434S, G236A, R292P и I377N; (iii) M428L, N434S, G236A и Y300L; (iv) M428L, N434S, G236A, R292P и Y300L; (v) M428L, N434S, G236A, L328V и Q295E, причем полипептид или антитело является афукозилированным; (vi) M428L, N434S, G236A, R292P и I377N, причем полипептид или антитело является

афукозилированным; (vii) M428L, N434S, G236A и Y300L, причем полипептид или антитело является афукозилированным; или (viii) M428L, N434S, G236A, R292P и Y300L, причем полипептид или антитело является афукозилированным. В некоторых вариантах осуществления, вариант полипептида Fc IgG содержит аминокислотные замены, которые состоят по существу из мутаций замены, указанных в (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii) или (viii) выше. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит легкую цепь каппа.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид или антитело по настоящему изобретению содержит антигенсвязывающий домен, содержащий VH и VL, причем указанные VH и VL содержат или состоят из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 43 и 44, соответственно, и полипептид или антитело дополнительно содержит вариант (например, IgG1) полипептида Fc IgG, причем указанный вариант содержит следующие мутации, согласно нумерации EU: (i) M428L, N434A, G236A, L328V и Q295E; (ii) M428L, N434A, G236A, R292P и I377N; (iii) M428L, N434A, G236A и Y300L; (iv) M428L, N434A, G236A, R292P и Y300L; (v) M428L, N434A, G236A, L328V и Q295E, причем полипептид или антитело является афукозилированным; (vi) M428L, N434A, G236A, R292P и I377N, причем полипептид или антитело является афукозилированным; (vii) M428L, N434A, G236A и Y300L, причем полипептид или антитело является афукозилированным; или (viii) M428L, N434A, G236A, R292P и Y300L, причем полипептид или антитело является афукозилированным. В некоторых вариантах осуществления, вариант (например, IgG1) полипептида Fc IgG содержит аминокислотные замены, которые состоят по существу из мутаций замены, указанных в (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii) или (viii) выше. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит легкую цепь каппа.

В определенных вариантах осуществления, антитело по настоящему изобретению содержит антигенсвязывающий домен из любого из следующих неограничительных антител: 3F8, 8H9, абаговомаб, абциксимаб, абитузумаб, абрилумаб, актоксумаб, адалимумаб, адекатумумаб, адуканумаб, афасевикумаб, афелимомаб, афутузумаб, алацизумаб пегол, ALD518, алемтузумаб, алирокумаб, алтумомаб пентетат, аматуксимаб, анатумомаб мафенатокс, анетумаб равтанзин, анифролумаб, анрукинзумаб, аполизумаб, арцитумомаб, аскринвакумаб, аселизумаб, атезолизумаб, атинумаб, атлизумаб, аторолимумаб, авелумаб, бапинеузумаб, базиликсимаб, бавитуксимаб, бектумомаб, бегеломаб, белимумаб, бенрализумаб, бертилимумаб, бесислесомаб, бевацизумаб,

безлотовкумаб, бициромаб, бимагрумаб, бимекизумаб, биватузумаб мертанзин, блеселумаб, блинатумомаб, блонтуветмаб, блосозумаб, бокоцизумаб, бразикумаб, брентуксимаб ведотин, бриакинумаб, бродалумаб, бролуцизумаб, бронтиксумаб, буросумаб, кабирализумаб, канакинумаб, кантузумаб мертанзин, кантузумаб равтанзин, каплацизумаб, капромаб пендетид, карлумаб, каротуксимаб, катумаксомаб, иммуноконъюгат сBR96-доксорубицин, цеделизумаб, цергугузумаб амуналейкин, цертолизумаб пегол, цетуксимаб, цитатузумаб богатокс, циксутумумаб, клазакизумаб, кленоликсимаб, кливатузумаб тетракетан, 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, ээлгемтумаб, элотузумаб, элсилимомаб, эмактузумаб, эмибетузумаб, эмицизумаб, энаватузумаб, энфортумаб ведотин, энлимомаб пегол, эноблитузумаб, энокизумаб, энотикумаб, энситуксимаб, эпитумомаб цитукситан, эпратузумаб, эренумаб, эрлизумаб, эртумаксомаб, этарацизумаб, этролизумаб, эвинакумаб, эволокумаб, эксбивирумаб, фанолесомаб, фаралимомаб, фарлетузумаб, фасинумаб, FBTA05, фелвизумаб, фезакинумаб, фибатузумаб, фиклатузумаб, фигитумумаб, фиривумаб, фланвотумаб, флетикумаб, фонтолизумаб, форалумаб, форавирумаб, фресолимумаб, фулранумаб, футуксимаб, галканезумаб, галиксимаб, гапитумаб, гантенерумаб, гавилимомаб, гемтузумаб озогамидин, гевокизумаб, гирентуксимаб, глембатумумаб ведотин, голимумаб, гомиликсимаб, гуселкумаб, ибализумаб, ибритумомаб тиуксетан, икрукумаб, идаруцизумаб, иговомаб, IMAV362, ималумаб, имциромаб, имгатузумаб, инклакумаб, индатуксимаб равтанзин, индугумаб ведотин, инебилизумаб, инфликсимаб, инолимомаб, инотузумаб озогамидин, интетумумаб, ипилимумаб, иратумумаб, исатуксимаб, итолизумаб, иксекизумаб, келиксимаб, лабетузумаб, лампализумаб, ланаделумаб, ландогрозумаб, лапритуксимаб эмтанзин, лебрикизумаб, лемалесомаб, лендализумаб, лензилумаб, лерделимумаб, лексатумумаб, либивирумаб, лифастузумаб ведотин, лигелизумаб, лилотомаб сатетракетан, линтузумаб, лирилумаб, лоделцизумаб, локиветмаб, лорвотузумаб мертанзин,

лукатумумаб, лулизумаб пегол, лумиликсимаб, лумретузумаб, MABp1, мапатумумаб, магретуксимаб, маслимомаб, матузумаб, маврилимумаб, меполизумаб, метелимумаб, милатузумаб, минретумомаб, мирветуксимаб соравтанзин, митумомаб, могамулизумаб, монализумаб, моролимумаб, мотавизумаб, моксетумомаб пасудотокс, муромонаб-CD3, наколомаб тафенатокс, намилумаб, наптумомаб эстафенатокс, наратуксимаб эмтанзин, нарнатумаб, натализумаб, навициксизумаб, 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, пасотуксизумаб, патеклизумаб, патритумаб, пембролизумаб, пемтумомаб, перакизумаб, пертузумаб, пекселизумаб, пидилизумаб, пинатузумаб ведотин, пинтумомаб, плакулумаб, плозализумаб, погализумаб, полатузумаб ведотин, понезумаб, презализумаб, приликсимаб, притоксаксимаб, притумумаб, PRO 140, иначе называемый леронлимаб, квиллизумаб, ракотумомаб, радретумаб, рафивирумаб, ралпанцизумаб, рамуцирумаб, ранибизумаб, раксибакумаб, рефанезумаб, регавирумаб, реслизумаб, рилотумумаб, ринукумаб, рисанкизумаб, ритуксимаб, ривабазумаб пегол, робатумумаб, роледумаб, ромосозумаб, ронтализумаб, ровалпитузумаб тезилин, ровелизумаб, руплизумаб, сацитумумаб говетикан, 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, сотровимаб, стамулумаб, сулесомаб, сувизумаб, табалумаб, такатузумаб тетракетан, 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, тоситумомаб, товетумаб, тралокинумаб, трастузумаб, трастузумаб эмтанзин, TRBS07, трегализумаб, тремелимумаб, тревогрумаб, тукотузумаб целмолейкин, тувирумаб, ублитуксимаб, улокуплумаб, урелумаб, уртоксазумаб, устекинумаб, утомилумаб,

вадастуксимаб талирин, вандортузумаб ведотин, вантуктумаб, вануцизумаб, вапаликсимаб, варлилумаб, вателизумаб, ведолизумаб, велтузумаб, вепалимомаб, весенкумаб, висилизумаб, вобарилизумаб, волоциксимаб, ворсетузумаб мафодотин, вотумумаб, ксентузумаб, залутумумаб, занолимумаб, затуксимаб, зиралимумаб, золимомаб аритокс, и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид или антитело содержат изотип IgG1. В определенных вариантах осуществления, полипептид или антитело содержат аллотип IgG1m17, аллотип IgG1m17, 1, аллотип IgG1m3, или аллотип IgG1m3, 1.

В некоторых вариантах осуществления, вариант полипептида Fc IgG не содержит каких-либо других аминокислотных мутаций замены по сравнению с дикого типа или исходным полипептидом Fc IgG. В других вариантах осуществления, вариант полипептида Fc IgG содержит не более чем: 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 дополнительную аминокислотную замену (замен) по сравнению с дикого типа или исходным полипептидом Fc IgG, причем одна или несколько дополнительная аминокислотная замена (замены) необязательно содержит консервативную аминокислотную замену. В других вариантах осуществления, вариант полипептида Fc IgG имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 96% или по меньшей мере 97% идентичности с дикого типа или исходным полипептидом Fc IgG.

В определенных вариантах осуществления, VH и вариант полипептида Fc IgG входят в состав тяжелой цепи, и тяжелая цепь содержит VH-CH1-CH2-CH3. В определенных вариантах осуществления, VL входит в состав легкой цепи, которая дополнительно содержит легкую цепь каппа (например, IgG1). В других вариантах осуществления, VL входит в состав легкой цепи, которая дополнительно содержит легкую цепь лямбда (например, IgG1).

«Fab» (антигенсвязывающий фрагмент) представляет собой часть антитела, которая связывается с антигеном и включает переменную область и CH1 тяжелой цепи, соединенные с легкой цепью с помощью межцепочечной дисульфидной связи. Каждый фрагмент Fab является моновалентным по отношению к связыванию антигена, *т.е.*, он имеет один антигенсвязывающий сайт. Обработка антитела пепсином дает один большой фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, который примерно соответствует двум связанным дисульфидными

связями фрагментам Fab, имеет двухвалентную антигенсвязывающую активность, и сохраняет способность к перекрестному связыванию с антигеном. Как Fab, так и F(ab')<sub>2</sub> являются примерами «антигенсвязывающих фрагментов». Фрагменты Fab' отличаются от фрагментов Fab наличием нескольких дополнительных остатков на карбоксильном конце домена CH<sub>1</sub>, включая один или несколько цистеинов из шарнирной области антитела. В данном документе Fab'-SH используется для обозначения Fab', в которых остаток (остатки) цистеина константных доменов несет свободную тиольную группу. Фрагменты антител F(ab')<sub>2</sub> первоначально были получены как пары фрагментов Fab', имеющие между ними шарнирные цистеины. Также известны другие химические связи фрагментов антител.

«Fv» представляет собой малый фрагмент антитела, который содержит полный антигенраспознающий и антигенсвязывающий сайт. Этот фрагмент обычно состоит из димера, содержащего по одному домену переменных областей тяжелой и легкой цепей, находящихся в тесной нековалентной связи. Однако, даже один переменный домен (или половина Fv, содержащая только три CDR, специфичных к антигену) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя обычно с более низкой аффинностью, чем цельный связывающий сайт.

«Одноцепочечный Fv», также сокращенно обозначаемый как «sFv» или «scFv», представляет собой фрагменты антител, которые содержат домены V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> антитела, соединенные в одну полипептидную цепь. В некоторых вариантах осуществления, полипептид scFv содержит полипептидный линкер, расположенный между и связывающий домены V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>, что позволяет scFv сохранять или образовывать желательную структуру для связывания антигена. Такой пептидный линкер может быть включен в слитый полипептид с использованием стандартных методов, хорошо известных в данной области техники. Дополнительно или альтернативно, Fv может иметь дисульфидную связь, образованную между V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> и стабилизирующую их. Обзор scFv приведен Pluckthun в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, *ниже*. В определенных вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит scFv, содержащий домен V<sub>H</sub>, домен V<sub>L</sub>, и пептидный линкер, связывающий домен V<sub>H</sub> с доменом V<sub>L</sub>. В конкретных вариантах осуществления, scFv содержит домен V<sub>H</sub>, связанный с доменом V<sub>L</sub> пептидным линкером, который может находиться в ориентации V<sub>H</sub>-линкер-V<sub>L</sub> или в ориентации V<sub>L</sub>-линкер-V<sub>H</sub>. Любой scFv по настоящему

изобретению может быть сконструирован таким образом, чтобы С-терминальный конец домена VL был связан короткой пептидной последовательностью с N-терминальным концом домена VH, или наоборот (т.е. (N)VL(C)-линкер-(N)VH(C) или (N)VH(C)-линкер-(N)VL(C)). Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления, линкер может быть связан с N-терминальной областью или концом домена VH, домена VL, или обоих. scFv могут быть включены в виде слитого продукта, или связаны, или конъюгированы с Fc-вариантом или антителом по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления, предусматривается антитело, которое содержит вариант IgG (например, IgG1) Fc, причем вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, валин (V) в положении 328 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 295 по EU. В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любая другая мутация (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе.

В других вариантах осуществления, предусматривается антитело, которое содержит вариант Fc IgG (например, IgG1), причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, аланин (A) в положении 230 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 295 по EU. В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любая другая мутация (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе.

В других вариантах осуществления, предусматривается антитело, которое содержит вариант Fc IgG (например, IgG1), причем вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, пролин (P) в положении 292 по EU и аспарагин (N) в положении 377 по EU. В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любая другая мутация (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе.

В других вариантах осуществления, предусматривается антитело, которое содержит вариант Fc IgG (например, IgG1), причем вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, аланин (A) в положении 334 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 295 по EU. В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любая другая

мутация (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе.

В других вариантах осуществления, предусматривается антитело, которое содержит вариант Fc IgG (например, IgG1), причем вариант содержит серин (S) в положении 236 по EU, пролин (P) в положении 292 по EU и лейцин (L) в положении 300 по EU. В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любая другая мутация (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе.

В других вариантах осуществления, предусматривается антитело, которое содержит вариант Fc IgG (например, IgG1), причем вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU и лейцин (L) в положении 300 по EU. В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любая другая мутация (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе.

В других вариантах осуществления, предусматривается антитело, которое содержит вариант Fc IgG (например, IgG1), причем вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, пролин (P) в положении 292 по EU и лейцин (L) в положении 300 по EU. В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любая другая мутация (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе.

В других вариантах осуществления, предусматривается антитело, которое содержит вариант Fc IgG (например, IgG1), причем вариант содержит серин (S) в положении 236 по EU, валин (V) в положении 420 по EU, глутаминовую кислоту (E) в положении 446 по EU и треонин (T) в положении 309 по EU. В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любая другая мутация (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе.

В других вариантах осуществления, предусматривается антитело, которое содержит вариант Fc IgG (например, IgG1), причем вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU и лейцин (L) в положении 300 по EU. В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и

N434A, или любая другая мутация (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе.

В других вариантах осуществления, предусматривается антитело, которое содержит вариант Fc IgG (например, IgG1), причем вариант содержит пролин (P) в положении 292 по EU и лейцин (L) в положении 300 по EU. В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любая другая мутация (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе.

В других вариантах осуществления, предусматривается антитело, которое содержит вариант Fc IgG (например, IgG1), причем вариант содержит лейцин (L) в положении 300 по EU. В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любая другая мутация (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе.

В других вариантах осуществления, предусматривается антитело, которое содержит вариант Fc IgG (например, IgG1), причем вариант содержит лизин (K) в положении 345 по EU, серин (S) в положении 236 по EU, тирозин (Y) в положении 235 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 267 по EU. В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любая другая мутация (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе.

В других вариантах осуществления, предусматривается антитело, которое содержит вариант Fc IgG (например, IgG1), причем вариант содержит аргинин (R) в положении 272 по EU, треонин (T) в положении 309 по EU, тирозин (Y) в положении 219 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 267 по EU. В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любая другая мутация (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе.

В других вариантах осуществления, предусматривается антитело, которое содержит вариант Fc IgG (например, IgG1), причем вариант содержит тирозин (Y) в положении 236 по EU. В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любая другая

мутация (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе.

В других вариантах осуществления, предусматривается антитело, которое содержит вариант Fc IgG (например, IgG1), причем вариант содержит триптофан (W) в положении 236 по EU. В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любая другая мутация (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе.

В других вариантах осуществления, предусматривается антитело, которое содержит вариант Fc IgG (например, IgG1), причем вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, при этом полипептид Fc IgG или его фрагмент и, необязательно, полипептид, является афукозилированным, и при этом, дополнительно необязательно, вариант содержит лейцин (L) в положении 330 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 332 по EU, при этом, еще дополнительно необязательно, вариант не содержит аспарагиновую кислоту (D) в положении 239 по EU и, еще дополнительно необязательно, содержит серин (S) в положении 239 по EU. В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любая другая мутация (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе.

В других вариантах осуществления, предусматривается антитело, которое содержит вариант Fc IgG (например, IgG1), причем вариант содержит лейцин (L) в положении 243 по EU, глутаминовую кислоту (E) в положении 446 по EU, лейцин (L) в положении 396 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 267 по EU. В некоторых дополнительных вариантах осуществления присутствуют мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любая другая мутация (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе.

В других вариантах осуществления, предусматривается антитело, которое содержит вариант Fc IgG (например, IgG1), причем вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, аспарагиновую кислоту (D) в положении 239 по EU, глутаминовую кислоту (E) в положении 332 по EU, лейцин (L) в положении 428 по EU и серин (S) или аланин (A) в положении 434 по EU.

В других вариантах осуществления, предусматривается антитело, которое содержит вариант Fc IgG (например, IgG1), причем вариант содержит аланин (A) в

положении 236 по EU, аспарагиновую кислоту (D) в положении 239 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении по EU 268.

В некоторых вариантах осуществления, антитело дополнительно содержит мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A, или любую другую мутацию (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе.

В определенных вариантах осуществления, антитело является афукозилированным.

В любых из раскрытых в данном документе полипептидов или антител, вариант Fc или его фрагмент может быть получен из изоформа IgG1, изоформа IgG2, изоформа IgG3 или изоформа IgG4. В определенных вариантах осуществления, вариант получен из Fc человека или его фрагмента, или из тяжелой цепи антитела человека или его фрагмента. В дополнительных вариантах осуществления, вариант получен из изоформа IgG1 человека, изоформа IgG2 человека, изоформа IgG3 человека или изоформа IgG3 человека. В конкретных вариантах осуществления, вариант получен из изоформа IgG1 человека.

Полипептид, CH2, Fc, CH3, фрагмент или часть Fc, или антитело, может относиться к любому аллотипу или комбинации аллотипов. «Аллотип» относится к аллельным вариантам, встречающимся среди подклассов IgG. Например, аллотип может включать G1m1 (или G1m(a)), G1m2 (или G1m(x)), G1m3 (или G1m(f)), G1m17 (или Gm(z)m), G1m27, и/или G1m28 (G1m27 и G1m28 были описаны как «аллоаллотипы»).

Аллотипы G1m3 и G1m17 расположены в одном и том же положении в домене CH1 (положение 214 в соответствии с нумерацией EU). G1m3 содержит R214 (EU), в то время как G1m17 содержит K214 (EU). Аллотип G1m1 расположен в домене CH3 (в положениях 356 и 358 (EU)) и относится к заменам E356D и M358L. Аллотип G1m2 относится к замене аланина в положении 431 (EU) на глицин. Аллотипы G1m, аллоаллотипы, и их признаки известны в данной области техники и описаны, например, в [www.imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/allotypes/human/IGH/IGHC/G1m\\_allotypes.html](http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/allotypes/human/IGH/IGHC/G1m_allotypes.html) и Lefranc, M.-P. and Lefranc, G. Human Gm, Km and Am allotypes and their molecular characterization: a remarkable demonstration of polymorphism, в: B. Tait, F. Christiansen (Eds.), Immunogenetics, chap. 34, Humana Press, Springer, New York, USA. Methods Mol. Biol. 2012; 882, 635-680. PMID: 22665258, LIGM: 406, содержание и аллотипы и информация об аллотипах из которых включены в данный документ посредством ссылки.

Аллотип G1m1 может быть объединен, например, с аллотипом G1m3, G1m17, G1m27, G1m2 и/или G1m28. В некоторых вариантах осуществления, аллотип

представляет собой G1m3 без G1m1 (G1m3,-1). В некоторых вариантах осуществления, аллотип представляет собой аллотип G1m17,1. В некоторых вариантах осуществления, аллотип представляет собой G1m3,1. В некоторых вариантах осуществления, аллотип представляет собой G1m17 без G1m1 (G1m17,-1). Необязательно, такие аллотипы могут быть объединены (или не объединены) с аллотипом G1m2, G1m27 или G1m28. Например, аллотип может представлять собой G1m17,1,2.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид, CH2, Fc, фрагмент или часть Fc, или антитело по настоящему изобретению содержит аллотип G1m3 или аллотип G1m3,1. В некоторых вариантах осуществления, полипептид, CH2, Fc, фрагмент или часть Fc, или антитело по настоящему изобретению содержит аллотип G1m3 и содержит мутации M428L и N434S или M428L и N434A или любую другую мутацию (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления, полипептид, CH2, Fc, фрагмент или часть Fc, или антитело по настоящему изобретению содержит аллотип G1m3,1 и содержит мутации M428L и N434S или M428L и N434A или любую другую мутацию (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления, полипептид, CH2, Fc, фрагмент или часть Fc, или антитело по настоящему изобретению содержит аллотип G1m17,1. В некоторых вариантах осуществления, полипептид, CH2, Fc, фрагмент или часть Fc, или антитело по настоящему изобретению содержит аллотип G1m17,1 и содержит мутации M428L и N434S или M428L и N434A или любую другую мутацию (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, как описано далее в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид, CH2, Fc, фрагмент или часть Fc, или антитело по настоящему изобретению: (i) способны связываться с FcγRIIIa человека, причем FcγRIIIa человека содержит V158, F158, или оба; (ii) способны связываться с FcγRIIIb человека; (iii) способны связываться с FcRn человека, необязательно при pH 6; (iv) способны связываться с компонентом 1q (C1q) комплемента человека, необязательно со связыванием, повышенным более чем 1-кратно, по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 3-кратно, или по меньшей мере 4-кратно по сравнению со связыванием антитела, содержащего референсный полипептид Fc (или по сравнению со связыванием референсного полипептида, CH2, Fc, фрагмента или части Fc); (v) имеют более высокую Tm, и/или могут продуцироваться с более высоким титром, и/или способны связываться с FcγRIIIa человека (необязательно, H131 и/или R131) с более

высокой аффинностью и/или авидностью, и/или способны связываться с Fc $\gamma$ RIIb человека с более низкой аффинностью и/или авидностью, по сравнению с (1) референсным антителом (или референсным полипептидом, CH<sub>2</sub>, Fc, фрагментом или частью Fc), которое содержит Fc IgG1 человека, содержащий аминокислотные замены G236A, S239D, A330L и I330E (нумерация EU), причем референсное антитело необязательно не содержит каких-либо других аминокислотных замен в Fc по сравнению с Fc IgG1 человека дикого типа, (2) референсным антителом (или референсным полипептидом, CH<sub>2</sub>, Fc, фрагментом или частью Fc), которое содержит Fc IgG1 человека, содержащий аминокислотные замены G236A, A330L и I330E (нумерация EU), причем референсное антитело (или референсный полипептид, CH<sub>2</sub>, Fc, фрагмент или часть Fc) необязательно (a) дополнительно содержит мутации M428L и N434S или M428L и N434A или любую другую мутацию (мутации), которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как описанные в данном документе, и/или (b) не содержит каких-либо других аминокислотных замен в Fc по сравнению с Fc IgG1 человека дикого типа и/или (c) не содержит мутацию S239D, (3) референсным антителом (или референсным полипептидом, CH<sub>2</sub>, Fc, фрагментом или частью Fc), содержащим Fc IgG1 человека, которое содержит аминокислотную замену G236A или G236S (нумерация EU) и, необязательно, не содержит каких-либо других аминокислотных замен в Fc по сравнению с Fc IgG1 человека дикого типа, (4) референсным антителом (или референсным полипептидом, CH<sub>2</sub>, Fc, фрагментом или частью Fc), которое содержит Fc IgG1 человека, содержащий аминокислотные замены A330L и I332E (нумерация EU), причем референсное антитело (или референсный полипептид, CH<sub>2</sub>, Fc, фрагмент или часть Fc) необязательно не содержит каких-либо других аминокислотных замен в Fc по сравнению с Fc IgG1 человека дикого типа; и/или (5) референсным антителом (или референсным полипептидом, CH<sub>2</sub>, Fc, фрагментом или частью Fc), содержащим Fc IgG1 человека дикого типа; (vi) способны стимулировать сигнализацию через Fc $\gamma$ Ra в клетке-хозяине, причем, необязательно, (a) сигнализация повышена по сравнению с сигнализацией, стимулируемой референсным антителом и/или (b) при этом Fc $\gamma$ Ra включает H131 Fc $\gamma$ RIIa, R131 Fc $\gamma$ RIIa, V158 Fc $\gamma$ RIIIa, F158 Fc $\gamma$ RIIIa, или любую их комбинацию; (vii) способны стимулировать антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦТ); (viii) способны стимулировать антитело-зависимый фагоцитоз (АЗКФ); (ix) способны стимулировать комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ); (x) способны образовывать иммунный комплекс; или (xi) любая комбинация (i)-(x).

В некоторых вариантах осуществления, вариант Fc антитела (или полипептида) дополнительно содержит одну или несколько модификаций, которые усиливают связывание с FcRn человека по сравнению с (1) референсным антителом, содержащим полипептид Fc IgG1 человека дикого типа и/или с (2) антителом без одной или нескольких модификаций. В определенных вариантах осуществления, модификация, которая усиливает связывание с FcRn человека, содержит любую одну или несколько из следующих мутаций замены: M428L; N434S; N434H; N434A; N434S; M252Y; S254T; T256E; T250Q; P257I; Q311I; D376V; T307A; E380A (нумерация EU). В определенных вариантах осуществления, мутация содержит M428L/N434S (также называемую в данном документе «MLNS» или «LS»). В определенных вариантах осуществления, мутация содержит M428L/N434A (также называемую в данном документе «MLNA» или «LA»). В определенных вариантах осуществления, мутация содержит M252Y/S254T/T256E. В определенных вариантах осуществления, мутация содержит T250Q/M428L. В определенных вариантах осуществления, мутация содержит P257I/Q311I. В определенных вариантах осуществления, мутация содержит P257I/N434H. В определенных вариантах осуществления, мутация содержит D376V/N434H. В определенных вариантах осуществления, мутация содержит T307A/E380A/N434A. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько модификаций, которые усиливают связывание с FcRn человека, содержит аминокислотные замены: (i) M428L/N434S; (ii) M252Y/S254T/T256E; (iii) T250Q/M428L; (iv) P257I/Q311I; (v) P257I/N434H; (vi) D376V/N434H; (vii) T307A/E380A/N434A; (viii) M428L/N434A; или (ix) любую комбинацию (i)-(viii).

В некоторых вариантах осуществления предусматривается антитело, которое содержит, в тяжелой цепи IgG1 человека, аминокислотную мутацию (мутации), представленную в любом из (i)-(xvii): (i) G236A, L328V и Q295E; (ii) G236A, P230A и Q295E; (iii) G236A, R292P и I377N; (iv) G236A, K334A и Q295E; (v) G236S, R292P и Y300L; (vi) G236A и Y300L; (vii) G236A, R292P и Y300L; (viii) G236S, G420V, G446E и L309T; (ix) G236A и R292P; (x) R292P и Y300L; (xi) G236A и R292P; (xii) Y300L; (xiii) E345K, G236S, L235Y, и S267E; (xiv) E272R, L309T, S219Y, и S267E; (xv) G236Y; (xvi) G236W; (xvii) F243L, G446E, P396L, и S267E, причем нумерация аминокислотных остатков соответствует индексу EU, как указано в Kabat. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, антитело содержит мутации M428L и N434S или мутации M428L и N434A.

В некоторых вариантах осуществления, предусматривается полипептид, который содержит по меньшей мере часть тяжелой цепи IgG1 человека, содержащий аминокислотную мутацию (мутации), представленную в любом из (i)-(xvii): (i) G236A, L328V и Q295E; (ii) G236A, P230A и Q295E; (iii) G236A, R292P и I377N; (iv) G236A, K334A и Q295E; (v) G236S, R292P и Y300L; (vi) G236A и Y300L; (vii) G236A, R292P и Y300L; (viii) G236S, G420V, G446E и L309T; (ix) G236A и R292P; (x) R292P и Y300L; (xi) G236A и R292P; (xii) Y300L; (xiii) E345K, G236S, L235Y и S267E; (xiv) E272R, L309T, S219Y и S267E; (xv) G236Y; (xvi) G236W; (xvii) F243L, G446E, P396L и S267E, причем нумерация аминокислотных остатков соответствует индексу EU, как указано в Kabat.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или полипептид дополнительно содержит одну или несколько мутаций, которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как мутации M428L и N434S, или мутации M428L и N434A.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:6-23 и 45, или ее вариант, например, дополнительно содержащий одну или несколько мутаций, которые усиливают связывание с FcRn человека, такие как мутации M428L и N434S или мутации M428L и N434A.

В любых из раскрытых в данном документе вариантах осуществления, вариант Fc антитела может не содержать каких-либо дополнительных мутаций по сравнению с референсным Fc IgG дикого типа.

В любых из раскрытых в данном документе вариантах осуществления, антитело способно специфически связываться с: (i) мишенью (например, антигеном), которая экспрессируется или продуцируется патогеном (например, вирусом, бактерией, паразитом, грибом) или клеткой, инфицированной патогеном, причем, необязательно, указанный патоген содержит вирус и указанный вирус включает: коронавирусы; бетакоронавирус; сарбековир; эмбековир; нобековир; мербековир; метапневмовир; гибековир; SARS-CoV-2; вирус гепатита В; вирус гепатита D; вирус гепатита С; цитомегаловир; вирус гриппа А; вирус гриппа В; вирус иммунодефицита человека; респираторный вирус; респираторно-синцитиальный вирус; вирус Зика; вирус бешенства; вирус денге; флавивир; эболавир; риновирус; или любую их комбинацию; (ii) мишенью (например, антигеном), которая экспрессируется из, и/или экспрессируется на клеточной поверхности, опухолевой клетки, необязательно, раковой клетки или клетки

пролиферативного или гиперпролиферативного расстройства; (iii) мишенью (например, антигеном), которая ассоциирована с аутоиммунным заболеванием; (iv) мишенью (например, антигеном), которая ассоциирована с нейродегенеративным заболеванием (например, тау, альфа-синуклеином, амилоидом-бета и т.п.); (v) сигнальной молекулой иммунной системы, такой как цитокин; (vi) мишенью (например, антигеном), которая ассоциирована с воспалением; (vii) мишенью (например, антигеном), которая ассоциирована с неинфекционным заболеванием; или (viii) любой комбинацией (i)-(vii).

В некоторых вариантах осуществления, антитело по настоящему изобретению специфически связывается с любой одной или несколькими из следующих мишеней: бета-амилоид, 4-1BB, 5A3, 5T4, альфа-фетопротеин, ангиопоэтин, AOC3, B7-H3, BAFF, с-MET, с-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, ВИЧ-1, HSP90, ICAM-1, IFN-a, IFN-g, 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, E,-Ib, IL-22, IL-23, IL23A, интегрин, ITGA2, IGTB2, антиген Льюиса-Y, LFA-1, LOXL2, LTA, MCP-1, MIF, MS5A1, MUC1, MUC16, MSLN, миостатин, суперсемейство MMP (матричных металлопротеиназ), 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, SIRPa, SOST, SHP1, SHP2, STEAP1, TAG-72, TEM1, TIGIT, TFPI, TGF-b, TNF-a, суперсемейство TNF (фактор некроза опухолей), суперсемейство TRAIL, Toll-подобные рецепторы, суперсемейство WNT, VEGF-A, VEGFR-1, VWF, цитомегаловирус (CMV), респираторно-синцитиальный вирус (RSV), гепатит В, гепатит С, гемагглютинин гриппа А, вирус бешенства, вирус ВИЧ, вирус простого герпеса, и их комбинации. Другие мишени или антигены описаны в патенте США 9803023, патенте США 9663582 и US20170349662, содержание которых включено в данный документ.

В некоторых вариантах осуществления, раковое заболевание выбирают из солидного рака и гематологических злокачественных новообразований. В определенных вариантах осуществления, антиген выбирают из ROR1, CD19, CD20, CD22, EGFR,

EGFRvIII, EGP-2, EGP-40, GD2, GD3, HPV E6, HPV E7, HER2, L1-CAM, Льюиса А, Льюиса Y, MUC1, MUC16, PSCA, PSMA, CD56, CD23, CD24, CD30, CD33, CD37, CD44v7/8, CD38, CD56, CD123, CA125, c-MET, FcRH5, WT1, фолатного рецептора  $\alpha$ , VEGF- $\alpha$ , VEGFR1, VEGFR2, IL-13R $\alpha$ 2, IL-11R $\alpha$ , MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, SSX-2, PRAME, HA-1, кор-связывающего фактора (CBF), PSA, эфрина A2, эфрина B2, NKG2D, NY-ESO-1, TAG-72, мезотелина, NY-ESO,  $\alpha$ -фетопропротеина, CAR15-3, hCG или бета-hcG, 5T4, BCMA, FAP, карбоангидразы 9, BRAF,  $\beta$ 2M, ETA, тирозиназы, KRAS, NRAS, MR1 или раково-эмбрионального антигена (CEA).

В определенных вариантах осуществления, раковое заболевание включает карциному, саркому, глиому, лимфому, лейкоз, миелому, или любую их комбинацию. В определенных вариантах осуществления, рак включает рак головы и шеи, меланому, рак поджелудочной железы, холангиокарциному, печеночноклеточный рак, рак молочной железы, включая трижды негативный рак молочной железы (TNBC), рак желудка, немелкоклеточный рак легкого, рак предстательной железы, рак пищевода, мезотелиому, мелкоклеточный рак легкого, колоректальный рак, глиобластому, или любую их комбинацию.

В определенных вариантах осуществления, рак включает опухоль Аскина, гроздевидную саркому, хондросаркому, саркому Юинга, PNET (периферическую нейроэктодермальную опухоль), злокачественную гемангиоэндотелиому, злокачественную шванному, остеосаркому, альвеолярную саркому мягких тканей, ангиосаркому, листовидную цистосаркому, взрывающую дерматофибросаркому (DFSP), десмоидную опухоль, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, эпителиоидную саркому, внескелетную хондросаркому, внескелетную остеосаркому, фибросаркому, желудочно-кишечную стромальную опухоль (GIST), гемангиоперицитому, гемангиосаркому, саркому Капоши, лейомиосаркому, липосаркому, лимфангиосаркому, лимфосаркому, недифференцированную плеоморфную саркому, злокачественную опухоль оболочек периферических нервов (MPNST), нейрофибросаркому, рабдомиосаркому, синовиальную саркому, недифференцированную плеоморфную саркому, плоскоклеточную карциному, базальноклеточную карциному, аденокарциному, диффузный рак желудка, випому, холангиокарциному, печеночноклеточную карциному, аденокистозную карциному, почечноклеточную карциному, опухоль Гравитца, эпендимому, астроцитому, олигодендроглиому, глиому ствола головного мозга, глиому глазного нерва, смешанную глиому, лимфому Ходжкина, В-клеточную лимфому,

неходжкинскую лимфому (NHL), лимфому Беркитта, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, иммунобластную крупноклеточную лимфому, В-лимфобластный лейкоз из клеток-предшественников и мантийноклеточную лимфому, макроглобулинемию Вальденстрёма, CD37+ дендритноклеточную лимфому, лимфоплазмочитарную лимфому, лимфому маргинальной зоны селезёнки, экстранодальную В-клеточную лимфому из клеток краевой зоны лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой (MALT), нодальную В-клеточную лимфому маргинальной зоны, медиастинальную (тимическую) крупноклеточную В-клеточную лимфому, внутрисосудистую крупноклеточную В-клеточную лимфому, первичную выпотную лимфому, Т-клеточную лимфому взрослых, экстранодальную ЕК/Т-клеточную лимфому назального типа, ассоциированную с энтеропатией Т-клеточную лимфому, гепатоспленическую Т-клеточную лимфому, бластную ЕК-клеточную лимфому, синдром Сезари, ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому, анапластическую крупноклеточную лимфому, или любую их комбинацию.

В определенных вариантах осуществления, рак включает солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления, солидная опухоль представляет собой саркому или карциному. В определенных вариантах осуществления, солидную опухоль выбирают из: хондросаркомы; фибросаркомы (фибробластной саркомы); взрывающейся дерматофибросаркомы (DFSP); остеосаркомы; рабдомиосаркомы; саркомы Юинга; желудочно-кишечной стромальной опухоли; лейомиосаркомы; ангиосаркомы (сосудистой саркомы); саркомы Капоши; липосаркомы; плеоморфной саркомы; или синовиальной саркомы. В определенных вариантах осуществления, солидную опухоль выбирают из карциномы легкого (например, аденокарциномы, плоскоклеточной карциномы (эпидермоидной карциномы); плоскоклеточной карциномы; аденокарциномы; аденосквамозной карциномы; анапластической карциномы; крупноклеточной карциномы; мелкоклеточной карциномы; карциномы молочной железы (например, протоковой карциномы *in situ* (неинвазивной), лобулярной карциномы *in situ* (неинвазивной), инвазивной протоковой карциномы, инвазивной лобулярной карциномы, неинвазивной карциномы); карциномы печени (например, печеночноклеточной карциномы, холангиокарцином или рака желчных протоков); крупноклеточной недифференцированной карциномы, бронхоальвеолярной карциномы); карциномы яичника (например, опухоли поверхностного эпителия и стромы (аденокарциномы) или карциномы эпителия яичника (которая включает серозную опухоль, эндометриоидную

опухоль и муцинозную цистаденокарциному), эпидермоидной (плоскоклеточной карциномы), эмбриональной карциномы и хориокарциномы (опухолей зародышевых клеток)); карциномы почки (например, аденокарциномы почки, гипернефромы, переходноклеточной карциномы (почечной лоханки), плоскоклеточной карциномы, карциномы канальцев Беллини, светлоклеточной аденокарциномы, переходноклеточной карциномы, карциноидной опухоли почечной лоханки); карциномы надпочечника (например, адренокортикальной карциномы), карциномы яичка (например, карциномы зародышевых клеток (семиномы, хориокарциномы, эмбриональной карциномы, тератокарциномы), серозной карциномы); карциномы желудка (например, аденокарциномы); карциномы кишечника (например, аденокарциномы двенадцатиперстной кишки); колоректальной карциномы; или карциномы кожи (например, базальноклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы). В определенных вариантах осуществления, солидная опухоль представляет собой карциному яичника, карциному эпителия яичника, аденокарциному шейки матки или мелкоклеточную карциному, карциному поджелудочной железы, колоректальную карциному (например, аденокарциному или плоскоклеточную карциному), карциному легкого, карциному протоков молочной железы или аденокарциному предстательной железы.

В любых из раскрытых в данном документе вариантах осуществления, антитело может включать моноклональное антитело, химерное антитело, гуманизированное антитело, нейтрализующее антитело, антитело человека, IgNAR (иммуноглобулин с новым антигеновым рецептором), нанотело, полученное от верблюдовых, или любую их комбинацию.

Термин «моноклональное антитело» (mAb), используемый в данном документе, 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 некоторых случаях, в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, будучи направленными против одного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые включают разные антитела, направленные против разных эпитопов, каждое моноклональное антитело направлено против одного эпитопа антигена. В дополнение к их специфичности, преимуществом моноклональных антител является то, что они могут быть синтезированы

незагрязненными другими антителами. Термин «моноклональный» не должен истолковываться как требующий продуцирования антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, пригодные для использования по настоящему изобретению, могут быть получены методом гибридомы, впервые описанным Kohler *et al.*, *Nature* 256:495 (1975), или могут быть приготовлены с использованием методов рекомбинантных ДНК в бактериальных, эукариотических животных или растительных клетках (см., например, патент США 4816567). Моноклональные антитела могут также быть выделены из библиотек фаговых антител с использованием методик, описанных, например, в Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) и Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991). Моноклональные антитела могут также быть получены с использованием методов, раскрытых в публикации РСТ № WO 2004/076677A2.

Антитела по настоящему изобретению включают «химерные антитела», в которых часть тяжелой и/или легкой цепи является идентичной с или гомологичной соответствующим последовательностям в антителах, полученных от конкретного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, в то время как остальная цепь (цепи) идентична с или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, при условии, что они демонстрируют желательную биологическую активность (см. патенты США №№ 4816567; 5530101 и 7498415; и Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Например, химерные антитела могут содержать остатки, принадлежащие человеку и не принадлежащие человеку. Кроме того, химерные антитела могут содержать остатки, которые не присутствуют в реципиентном антителе или в донорном антителе. Такие модификации вносят для дополнительного улучшения характеристик антитела. Более подробная информация приведена в Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Химерные антитела также включают приматизированные и гуманизированные антитела.

«Гуманизированное антитело» обычно принято считать антителом человека, в которое был введен один или несколько аминокислотных остатков из источника, не являющегося человеком. Такие не являющиеся человеческими аминокислотные остатки обычно берут из вариабельного домена. Гуманизация может быть проведена по методу Винтера (Winter) и сотрудников (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann *et al.*,

*Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), путем замены не принадлежащих человеку вариабельных последовательностей на соответствующие последовательности антитела человека. Соответственно, такие «гуманизированные» антитела являются химерными антителами (патенты США №№ 4816567; 5530101 и 7498415), причем на соответствующую последовательность от вида, не являющегося человеком, заменяют значительно меньше, чем интактный вариабельный домен человека. В некоторых случаях, «гуманизированное» антитело представляет собой антитело, которое продуцируется не принадлежащей человеку клеткой или животным, и содержит последовательности человека, например, домены Hc.

При использовании в данном документе, «нейтрализующее антитело» представляет собой антитело, которое может нейтрализовать, *m.e.*, предотвращать, ингибировать, снижать, сдерживать или препятствовать способности патогена инициировать и/или поддерживать инфекцию у хозяина. Термины «нейтрализующее антитело» и «антитело, которое нейтрализует» или «антитела, которые нейтрализуют» в данном документе используются взаимозаменяемо. В любых из раскрытых в данном документе вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент может быть моноклональным.

«Антитело человека» представляет собой антитело, содержащее только последовательности, присутствующие в антителе, которое продуцируется человеком. Однако, при использовании в данном документе, антитела человека могут содержать остатки или модификации, не присутствующие в природном антителе человека (например, антителе, выделенном из человека), включая модификации и варианты последовательностей, описанные в данном документе. Их обычно выполняют для дополнительного улучшения или повышения характеристик антитела. В некоторых случаях, антитела человека продуцируются трансгенными животными. Например, *см.* патенты США №№ 5770429; 6596541 и 7049426.

В определенных вариантах осуществления, антитело включает мультиспецифическое антитело, такое как биспецифическое антитело, триспецифическое антитело или тетраспецифическое антитело. Примеры форматов антител раскрыты в Spiess *et al.*, *Mol. Immunol.* 67(2):95 (2015), и в Brinkmann and Kontermann, *mAbs* 9(2):182-212 (2017), причем форматы и способы их получения включены в данный документ посредством ссылок и включают, например, биспецифические активаторы Т-клеток (BiTE), DART (переориентирующиеся молекулы с двойной аффинностью), ансамбли

«выступы во впадины» (КИН), ансамбли scFv-CH3-КИН, КИН-антитела с общей легкой цепью, TandAb, Triple Bodies (тройные тела), минитела TriBi, Fab-scFv, scFv-CH-CL-scFv, F(ab')<sub>2</sub>-scFv<sub>2</sub>, тетравалентные HCab, интратела, CrossMab, Fab двойного действия (DAF) (два-в-одном или четыре-в-одном), DutaMab, DT-IgG, заряженные пары (Charge Pairs), Fab с заменой плеча (Fab-arm Exchange), SEEDbodies, Triomab, ансамбли LUZ-Y, Fcab (см. также Wozniak-Knopf *et al.*, *Protein Eng Des Sel.* 23(4):289-297 (2010) и Wozniak-Knopf *et al.*, *Protein Eng Des Sel.* 30(9):657-671 (2017)) κλ-тела, ортогональные Fab, DVD-Ig (например, патент США № 8258268, причем указанные форматы включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме), IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)IgG, IgG(L,H)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, КИН IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zyboby, и DVI-IgG (четыре-в-одном), а также так называемые FIT-Ig (например, публикация РСТ № WO 2015/103072, причем указанные форматы включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме), так называемые форматы WuxiBody (например, публикация РСТ № WO 2019/057122, причем указанные форматы включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме), и так называемые форматы In-Elbow-Insert Ig (IEI-Ig; например, публикации РСТ №№ WO 2019/024979 и WO 2019/025391, причем указанные форматы включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

В определенных вариантах осуществления, антитело входит в состав конъюгата антитела.

В определенных вариантах осуществления полипептид, полипептид Fc или антитело: (1) содержит слитый белок Fc; и/или (2) содержит Fcab. В некоторых вариантах осуществления, слитый белок Fc дополнительно содержит: (i) рецепторный домен (например, эктодомен рецепторного белка, или его лигандсвязывающий участок); (ii) лиганд; (iii) замещающий белок (например, фермент для использования в заместительной ферментной терапии); или (iv) любую комбинацию (i)-(iii).

В некоторых вариантах осуществления, полипептид или антитело по настоящему изобретению конъюгировано, связано, или слито с фрагментом полезной нагрузки. В определенных вариантах осуществления, фрагмент полезной нагрузки включает: антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; цитотоксический агент (например, химиотерапевтический агент); детектируемое соединение или детектируемую метку; олигонуклеотид (например, антисмысловый олигонуклеотид, миРНК и т.п.); вектор; агент, который стимулирует иммунный ответ; фактор роста; или любую их комбинацию.

Различные методики могут быть использованы для связывания фрагмента полезной нагрузки с полипептидом или антителом для образования конъюгата по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат содержит молекулу полезной нагрузки, которая ковалентно связана линкером с полипептидом или антителом. Линкеры, используемые в конъюгатах полипептидов или антител, содержащих цитотоксические или антипролиферативные агенты (например, конъюгаты антитело-лекарственное средство), обычно представляют собой органические соединения, которые относятся к одной из двух групп, сформированных в соответствии с механизмом, посредством которого молекула полезной нагрузки высвобождается из молекулы носителя. Расщепляемые линкеры предназначены для селективной деградации или расщепления в соответствии с присущими клетке-мишени свойствами: три типа расщепляемых линкеров представляют собой чувствительные к протеазам линкеры (при этом расщепление линкера, например, линкера, состоящего из дипептида валин-цитруллин или фенилаланин-лизин или тетрапептида (например, GFLG или ALAL), протеазами, присутствующими в лизосоме опухолевой клетки, высвобождает молекулу полезной нагрузки); pH-чувствительные линкеры, содержащие кислотно-лабильную группу, которая избирательно гидролизуется под действием более низкого pH эндосомального и лизосомального компартментов по сравнению с цитозольным pH; и глутатион-чувствительные линкеры, содержащие дисульфидный мостик, который восстанавливается внутриклеточным глутатионом. Нерасщепляемые линкеры полагаются на неспецифическую деградацию конъюгата для высвобождения молекулы полезной нагрузки.

Специфические линкеры, полезные нагрузки, химия линкеров, и связанные с ними механизмы и способы раскрыты в Nareshkumar et al., *Pharm. Res.* 32:3526-3540 (2015), причем указанные композиции, способы и методики включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В определенных вариантах осуществления, конъюгат содержит линкер, выбранный из расщепляемого линкера и нерасщепляемого линкера. В дополнительных вариантах осуществления, линкер представляет собой расщепляемый линкер, выбранный из чувствительных к протеазам линкеров, pH-чувствительных линкеров или глутатион-чувствительных линкеров. В конкретных вариантах осуществления, расщепляемый линкер представляет собой чувствительный к протеазам линкер, содержащий дипептид валин-цитруллин.

Линкер может быть связан или сопряжен с полипептидным антителом с использованием любой подходящей методики или механизма. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит малеимидную группу (необязательно пегилированную), способную реагировать с восстановленным дисульфидным мостиком в шарнирной области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Другие сайты на молекуле-носителе (т.е., антителе или его антигенсвязывающем фрагменте), пригодные для конъюгации с линкером, могут быть введены или сконструированы с помощью рекомбинантных методов, например, путем введения остатков цистеина или не природных аминокислот для сайт-специфической конъюгации. Способы введения таких модификаций включают, например, способ, описанный в Примерах 6.3-7 публикации РСТ № WO 2012/032181.

В некоторых вариантах осуществления линкер дополнительно содержит самоуничтожаемую группу, также называемую саморасщепляющейся группой или саморасщепляющимся спейсером, для содействия реакции селективного расщепления. В определенных вариантах осуществления, самоуничтожаемая группа представляет собой пара-аминобензиловый спирт (ПАВС).

Методы клик-химии, полезные для создания конъюгатов антител, включают описанные в Meyer et al., *Bioconjug. Chem.* 27(12):2791-2807 (2016), и включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

В любых из конъюгатов, описанных в данном документе, молекула полезной нагрузки может быть выбрана из терапевтического агента и детектируемого индикатора. Терапевтические агенты, пригодные для терапии рака, включают раскрытые в Parslow et al., *Biomedicines* 4:14 (2016), причем указанные полезные нагрузки и принципы конструирования ADC (конъюгатов антитело-лекарственное средство) настоящим включены посредством ссылки. В определенных вариантах осуществления, молекула полезной нагрузки представляет собой терапевтический агент, выбранный из нацеленного на тубулин антимиотического агента, пептидного токсина, димера пирролобензодиазепина (PBD), антибиотика (например, калихеамицина), ингибитора синтеза пиримидина (например, 5-фторурацила), антиметаболита (например, метотрексата), ДНК-алкилирующего агента и ингибитора топоизомеразы (например, доксорубицина). В дополнительных вариантах осуществления, молекулу полезной нагрузки выбирают из майтанзиноида, ауристатина, монометилауристатина E (ММАЕ) и монометилауристатина F (ММАF).

В других вариантах осуществления, молекула полезной нагрузки представляет собой детектируемый индикатор. Детектируемые индикаторы, пригодные для использования в конъюгатах, а также родственные стратегии мечения и методы визуализации (например, ПЭТ, МРТ, БИК), включают раскрытые в Friese and Wu, *Mol. Immunol.* 67(200):142-152 (2015) и Moek et al., *J. Nucl. Med.* 58:83S-90S (2017), которые все настоящим включены посредством ссылки. В определенных вариантах осуществления, детектируемый индикатор выбирают из радионуклида, красителя, радиоактивного металла, флуоресцентного фрагмента, контрастного агента для МРТ, микропузырька, углеродной нанотрубки, частицы золота, фтордезоксиглюкозы, фермента, хромофора и рентгеноконтрастного маркера. В конкретных вариантах осуществления, детектируемый индикатор представляет собой радионуклид, выбранный из  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{78}\text{Zr}$ ,  $^{18}\text{F}$  и  $^{124}\text{T}$ . В некоторых таких вариантах осуществления, конъюгат антитела дополнительно содержит комплексообразователь для радионуклида, выбранный из меченого малеимидом DOTA, N-гидроксисукцинамид-DOTA и дезферриоксиамина (ДФО).

В определенных вариантах осуществления, молекула полезной нагрузки ковалентно связана линкером с полипептидом или антителом. В определенных вариантах осуществления линкер выбирают из расщепляемого линкера и нерасщепляемого линкера. В определенных вариантах осуществления расщепляемый линкер представляет собой чувствительный к протеазам линкер, pH-чувствительный линкер или глутатион-чувствительный линкер. В определенных вариантах осуществления, расщепляемый линкер представляет собой чувствительный к протеазам линкер, содержащий дипептид валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит малеимидную группу. В определенных вариантах осуществления, раскрытое в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит восстановленный дисульфидный мостик в шарнирной области, и восстановленный дисульфидный мостик связан с малеимидной группой. Также в данном документе предусматриваются варианты осуществления, в которых линкер дополнительно содержит самоуничтожаемую группу, такую как, например, пара-аминобензиловый спирт (ПАВС). В определенных вариантах осуществления, полипептид или конъюгат антитела содержит раскрытый в данном документе полипептид или антитело и молекулу полезной нагрузки, которую выбирают из терапевтического агента и детектируемого индикатора. В определенных вариантах осуществления, молекула полезной нагрузки представляет собой терапевтический агент,

выбранный из нацеленного на тубулин антимиотического агента, пептидного токсина, димера пирролобензодиазепина (PBD), антибиотика, ингибитора синтеза пиримидина, антиметаболита, ДНК-алкилирующего агента и ингибитора топоизомеразы. В определенных вариантах осуществления, молекулу полезной нагрузки выбирают из майтанзиноида, ауристатина, доксорубицина, калихеамицина, димера PBD, монометилауристатина E (ММАЕ) и монометилауристатина F (ММАF). В некоторых других вариантах осуществления, молекула полезной нагрузки представляет собой детектируемый индикатор. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, детектируемый индикатор выбирают из радионуклида, красителя, радиоактивного металла, флуоресцентного фрагмента, контрастного агента для МРТ, микропузырька, углеродной нанотрубки, частицы золота, фтордезоксиглюкозы, фермента, хромофора и рентгеноконтрастного маркера. В конкретных вариантах осуществления, детектируемый индикатор представляет собой радионуклид, выбранный из  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{78}\text{Zr}$ ,  $^{18}\text{F}$  и  $^{124}\text{T}$ . В определенных вариантах осуществления, конъюгат содержит комплексобразователь для радионуклидов, выбранный из меченого малеимида DOTA, N-гидроксисукцинамид-DOTA, и дезферриоксамина (ДФО).

В определенных вариантах осуществления, полипептид или антитело: является афукозилированным; продуцировался в клетке-хозяине, неспособной к фукозилированию или с ингибированной способностью фукозилировать полипептид; продуцировался в условиях, при которых ингибируется его фукозилирование клеткой-хозяином; или любая их комбинация.

В определенных вариантах осуществления, полипептид или антитело содержат аминокислотную мутацию, которая (1) ингибирует фукозилирование по сравнению с референсным полипептидом или антителом, соответственно, и/или (2) которая подавляет сайт фукозилирования, присутствующий в референсном полипептиде или антителе, соответственно.

В определенных вариантах осуществления, полипептид или антитело содержат мутацию, которая изменяет гликозилирование, причем мутация, которая изменяет гликозилирование, включает N297A, N297Q или N297G, и/или полипептид или антитело являются частично или полностью агликозилированными и/или являются частично или полностью афукозилированными. Линии клеток-хозяев и способы получения частично или полностью агликозилированных или частично или полностью афукозилированных антител и антигенсвязывающих фрагментов являются известными (см., например,

публикацию PCT № WO 2016/181357; Suzuki *et al. Clin. Cancer Res.* 13(6):1875-82 (2007); Huang *et al. MAbs* 6:1-12 (2018)).

Следует понимать, что, например, продуцирование в клеточной линии млекопитающего может удалять один или несколько С-концевых лизинов Fc или тяжелой цепи антитела (см., например, Liu *et al. mAbs* 6(5):1145-1154 (2014)). Этот лизин соответствует положению 447 по EU. Соответственно, полипептид или антитело по настоящему изобретению может содержать тяжелую цепь, CH1-CH3, CH3 или полипептид Fc, причем С-концевой остаток лизина присутствует или отсутствует; другими словами, охватываются варианты осуществления, в которых С-концевой остаток тяжелой цепи, CH1-CH3 или полипептида Fc не является лизином (потому что С-концевой лизин был удален), и варианты осуществления, в которых лизин является С-концевым остатком. В определенных вариантах осуществления, композиция содержит множество полипептидов и/или антител по настоящему изобретению, причем один или несколько полипептидов или антител не содержат остатка лизина на С-терминальном конце тяжелой цепи, CH1-CH3 или полипептида Fc, и при этом один или несколько полипептидов или антител содержат остаток лизина на С-терминальном конце тяжелой цепи, CH1-CH3 или полипептида Fc.

### ***Полинуклеотиды, векторы и клетки-хозяева***

В другом аспекте, настоящее изобретение предусматривает выделенные полинуклеотиды, которые кодируют любые раскрытые в данном документе полипептиды, антитела, слитые белки, или их часть (например, CH2-CH3, CH2, шарнир-CH2, шарнир-CH2-CH3, CH1-CH3, тяжелую цепь и т.п.). В определенных вариантах осуществления, полинуклеотид оптимизирован по кодонам для экспрессии в клетке-хозяине. После того как кодирующая последовательность будет известна или идентифицирована, оптимизация кодонов может быть выполнена с помощью известных методов и инструментов, например, с использованием инструмента GenScript® OptimiumGene™ или синтезом гена с использованием GeneArt® (ThermoFisher); см. также Scholten *et al., Clin. Immunol.* 119:135, 2006). Оптимизированные по кодонам последовательности включают последовательности, которые являются частично оптимизированными по кодонам (*m.e.*, один или множество кодонов оптимизированы для экспрессии в клетке-хозяине), и те, которые полностью оптимизированы по кодонам.

Следует также понимать, что полинуклеотиды, кодирующие полипептиды (например, антитела) по настоящему изобретению, могут обладать разными

нуклеотидными последовательностями, кодируя при этом тот же самый полипептид или антитело, вследствие, например, вырожденности генетического кода, сплайсинга и т.п.

Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий полипептид или антитело, входит в состав полинуклеотида, который включает другие последовательности и/или функциональные особенности, например, для экспрессии полипептида или антитела в клетке-хозяине. Примеры функциональных особенностей включают промоторную последовательность, последовательность полиаденилирования, последовательность, кодирующую сигнальный пептид (например, расположенный на N-конце экспрессированной тяжелой цепи или легкой цепи антитела) и т.п.

В любых из раскрытых в данном документе вариантах осуществления, полинуклеотид может содержать дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) или рибонуклеиновую кислоту (РНК). В некоторых вариантах осуществления, РНК включает матричную РНК (мРНК).

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид включает модифицированный нуклеозид, структуру cap-1, структуру cap-2, или любую их комбинацию. В определенных вариантах осуществления, полинуклеотид включает псевдоуридин, N<sup>6</sup>-метиладенозин, 5-метилцитидин, 2-тиоуридин или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, псевдоуридин представляет собой N<sup>1</sup>-метилпсевдоуридин.

Также предусматриваются векторы, причем указанные векторы содержат или включают полинуклеотид, как раскрыто в данном документе (например, полинуклеотид, который кодирует полипептид или антитело, или их часть). Вектор может содержать любой один или несколько из векторов, раскрытых в данном документе. В конкретных вариантах осуществления предусматривается вектор, который содержит конструкт ДНК-плазмиды, кодирующей полипептид или антитело, или ее часть (например, так называемый «DMAb»; см., например, Muthumani *et al.*, *J Infect Dis.* 214(3):369-378 (2016); Muthumani *et al.*, *Hum Vaccin Immunother* 9:2253-2262 (2013)); Flingai *et al.*, *Sci Rep.* 5:12616 (2015); и Elliott *et al.*, *NPJ Vaccines* 18 (2017), причем указанные конструкты ДНК, кодирующие антитело, и связанные с ними способы применения, включая их введение, включены в данный документ посредством ссылки). В определенных вариантах осуществления, конструкт ДНК-плазмиды содержит одну открытую рамку считывания, кодирующую тяжелую цепь и легкую цепь (или VH и VL) полипептида или антитела,

причем последовательность, кодирующая тяжелую цепь, и последовательность, кодирующая легкую цепь, необязательно разделены полинуклеотидом, кодирующим сайт расщепления протеазой, и/или полинуклеотидом, кодирующим саморасщепляющийся пептид. В некоторых вариантах осуществления замещающие компоненты полипептида или антитела кодируются полинуклеотидом, содержащимся в одной плазмиде. В других вариантах осуществления, замещающие компоненты полипептида или антитела кодируются полинуклеотидом, содержащимся в двух или более плазмидах (например, первая плазида содержит полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, VH или VH+CH, и вторая плазида содержит полинуклеотид, кодирующий когнатную легкую цепь, VL или VL+CL). В определенных вариантах осуществления, одна плазида содержит полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь и/или легкую цепь из двух или более полипептидов или антител по настоящему изобретению. Примером экспрессионного вектора является pVax1, который поставляется фирмой Invitrogen®. ДНК-плазида по настоящему изобретению может быть доставлена субъекту, например, электропорацией (например, внутримышечной электропорацией), или с помощью соответствующего рецептурного состава (например, гиалуронидазы). В некоторых вариантах осуществления, вектор по настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид. Сигнальный пептид может присутствовать или не присутствовать (например, может быть ферментативно отщеплен) в зрелом полипептиде или антителе. В некоторых вариантах осуществления, вектор по настоящему изобретению содержит последовательность сигнала полиаденилирования.

В некоторых вариантах осуществления, вектор по настоящему изобретению содержит промотор CMV (цитомегаловируса).

В некоторых вариантах осуществления, предусматривается способ, который включает введение субъекту первого полинуклеотида (например, мРНК), кодирующего тяжелую цепь антитела или Fc-содержащий полипептид, и введение субъекту второго полинуклеотида (например, мРНК), кодирующего когнатную легкую цепь антитела или Fc-содержащий полипептид.

В некоторых вариантах осуществления, предусматривается полинуклеотид (например, мРНК), который кодирует тяжелую цепь и легкую цепь антитела или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, предусматривается полинуклеотид (например, мРНК), который кодирует две тяжелые цепи и две легкие цепи антитела или его антигенсвязывающий фрагмент. См., например,

Li, JQ., Zhang, ZR., Zhang, HQ. et al. Intranasal delivery of replicating mRNA encoding neutralizing antibody against SARS-CoV-2 infection in mice. *Sig Transduct Target Ther* 6, 369 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00783-1>, причем описанные в них кодирующие антитело мРНК-конструкты, векторы, и связанные с ними методики включены в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид доставляют субъекту с помощью системы доставки на основе репликонной частицы альфавируса (VRP). В некоторых вариантах осуществления, репликон включает модифицированный репликон VEEV, содержащий два субгеномных промотора. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид или репликон может транслировать одновременно тяжелую цепь (или VH, или VH+1) и легкую цепь (или VL, или VL+CL) антитела или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, предусматривается способ, который включает доставку субъекту такого полинуклеотида или репликона.

В дополнительном аспекте, настоящее изобретение также предусматривает клетку-хозяина, экспрессирующую полипептид или антитело в соответствии с настоящим изобретением; или содержащую или включающую вектор или полинуклеотид в соответствии с настоящим изобретением.

Примеры таких клетки включают, без ограничений, эукариотические клетки, например, дрожжевые клетки, животные клетки, клетки насекомых, растительные клетки; и прокариотические клетки, включая *E. coli*. В некоторых вариантах осуществления, указанные клетки являются клетками млекопитающих. В некоторых таких вариантах осуществления, клетки представляют собой клеточную линию млекопитающего, такую как клетки CHO (например, клетки DHFR-CHO (Urlaub *et al.*, *PNAS* 77:4216 (1980)), эмбриональные клетки почки человека (например, клетки HEK293T), клетки PER.C6, клетки Y0, клетки Sp2/0, клетки NS0, клетки печени человека, например, клетки Нера RG, клетки миеломы или клетки гибридомы. Другие примеры линий клеток-хозяев млекопитающих включают клетки Сертоли мышцы (например, клетки TM4); линию почки обезьян CV1, трансформированную SV40 (COS-7); клетки почки детенышей хомяков (BHK); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки почки обезьян (CV1); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Нер G2); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени крысы линии buffalo (BRL 3A); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI; клетки MRC 5; и клетки FS4. Линии клеток-хозяев млекопитающих, пригодные для

продуцирования полипептида или антитела, также включают описанные, например, в Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J.), pp. 255-268 (2003).

В определенных вариантах осуществления, клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку, такую как *E. coli*. Экспрессия пептидов в прокариотических клетках, таких как *E. coli*, хорошо изучена (см., например, Pluckthun, A. *Bio/Technology* 9:545-551 (1991)). Например, полипептиды или антитела могут продуцироваться в бактериях, в частности, когда гликозилирование и эффекторная функция Fc не требуются. Экспрессия фрагментов антител и полипептидов в бактериях описана, например, в патентах США №№ 5648237; 5789199; и 5840523.

В конкретных вариантах осуществления, указанная клетка может быть трансфицирована вектором, в соответствии с настоящим изобретением - экспрессионным вектором. Термин «трансфекция» относится к введению молекул нуклеиновой кислоты, таких как молекулы ДНК или РНК (например, мРНК), в клетки, такие как эукариотические клетки. В контексте данного описания, термин «трансфекция» охватывает любой известный специалисту способ введения молекул нуклеиновой кислоты в клетки, например, в эукариотические клетки, включая клетки млекопитающих. Такие способы охватывают, например, электропорацию, липофекцию, например, на основе катионных липидов и/или липосом, осаждение фосфатом кальция, трансфекцию на основе наночастиц, трансфекцию на основе вирусов, или трансфекцию на основе катионных полимеров, таких как DEAE-декстран или полиэтиленимин и т.д. В определенных вариантах осуществления введение является невирусным.

Кроме того, клетки-хозяева по настоящему изобретению могут быть стабильно или транзистентно трансфицированы вектором в соответствии с настоящим изобретением, например, для экспрессии полипептида или антитела в соответствии с настоящим изобретением. В таких вариантах осуществления клетки могут быть стабильно трансфицированы вектором, как описано в данном документе. Альтернативно, клетки могут быть транзистентно трансфицированы вектором в соответствии с настоящим изобретением, кодирующим полипептид или антитело, как раскрыто в данном документе. В любых из раскрытых в данном документе вариантах осуществления, полинуклеотид может быть гетерологичным клетке-хозяину.

Соответственно, настоящее изобретение также предусматривает рекомбинантные клетки-хозяева, которые гетерологично экспрессируют полипептид или антитело по

настоящему изобретению. Например, клетка может относиться к виду, отличного от вида, из которого был полностью или частично получен полипептид или антитело (например, клетки CHO, экспрессирующие антитело человека или генно-инженерное антитело человека). Кроме того, клетка-хозяин может вносить посттрансляционную модификацию (ПТМ; например, гликозилирование или фукозилирование) полипептида или антитела, не присутствующую в нативном (например, дикого типа) состоянии полипептида или антитела (или в нативном состоянии исходного антитела, из которого получают генно-инженерными методами или выделяют полипептид или антитело). Такая ПТМ может приводить к функциональным отличиям (например, пониженной иммуногенности). Соответственно, полипептид или антитело по настоящему изобретению, которые продуцируются клеткой-хозяином, как раскрыто в данном документе, могут включать одну или несколько посттрансляционных модификаций, которые отличаются от референсного полипептида или антитела в его нативном состоянии (например, Fc IgG1 человека дикого типа или антитело, продуцируемое клеткой CHO, может содержать больше посттрансляционных модификаций, которые отличаются от Fc или антитела, выделенного у человека, и/или продуцируемого нативными В-клетками человека или плазматитами).

Клетки насекомых, пригодные для экспрессии полипептида или антитела по настоящему изобретению, известны в данной области техники и включают, например, клетки Sf9 *Spodoptera frugiperda*, клетки BTI-TN5B1-4 *Trichoplusia ni* и клетки SfSWT01 «Mimic™» *Spodoptera frugiperda*. См., например, Palmberger *et al.*, *J. Biotechnol.* 153(3-4):160-166 (2011). Были идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы, которые могут быть использованы в сочетании с клетками насекомых, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

Эукариотические микроорганизмы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи, также являются пригодными хозяевами для клонирования или экспрессии кодирующих белок векторов, и включают штаммы грибов и дрожжей с «гуманизированными» путями гликозилирования, приводящими к продуцированию полипептида или антитела с частично или полностью человеческим профилем гликозилирования. См. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004); Li *et al.*, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Растительные клетки также могут быть использованы в качестве хозяев для экспрессии белка полипептида по настоящему изобретению. Например, технология PLANTIBODIES™ (описанная, например, в патентах США №№ 5959177; 6040498;

6420548; 7125978; и 6417429) использует трансгенные растения для продуцирования антител.

В определенных вариантах осуществления, клетка-хозяин включает клетку млекопитающего. В конкретных вариантах осуществления, клетка-хозяин представляет собой клетку CHO, клетку HEK293, клетку PER.C6, клетку Y0, клетку Sp2/0, клетку NS0, клетку печени человека, клетку миеломы или клетку гибридомы.

В родственном аспекте, настоящее изобретение предусматривает способы продуцирования полипептида или антитела, причем указанные способы включают культивацию клетки-хозяина по настоящему изобретению в условиях и в течение времени, достаточного для продуцирования полипептида или антитела. Способы, пригодные для выделения и очистки рекомбинантно продуцируемых полипептидов или антител, в качестве примера, могут включать получение супернатантов из пригодных систем клетка-хозяин/вектор, которые секретируют рекомбинантное антитело в культуральные среды, и затем концентрирование сред с использованием коммерчески доступного фильтра. После концентрирования, концентрат может быть нанесен на одну пригодную матрицу для очистки или на ряд пригодных матриц, таких как аффинная матрица или ионообменная смола. Могут быть использованы одна или несколько стадий обращеннофазовой ВЭЖХ для дополнительной очистки рекомбинантного полипептида или антитела. Такие способы очистки могут также использоваться при выделении иммуногена из его природного окружения. Способы крупномасштабного продуцирования одного или нескольких из выделенных/рекомбинантных полипептидов или антител, описанных в данном документе, включают периодическую клеточную культуру, которую контролируют и регулируют для поддержания требуемых условий культивации. Очистка растворимых полипептидов и антител может проводиться в соответствии со способами, описанными в данном документе и известными в данной области техники, и соответствующими законам и руководствам отечественных и зарубежных регулирующих органов.

### ***Композиции***

Также в данном документе предусматриваются композиции, которые содержат любой один или несколько из раскрытых в данном документе полипептидов, антител, полинуклеотидов, векторов или клеток-хозяев, по отдельности или в любой комбинации, и может дополнительно включать фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент

или разбавитель. Носители, эксципиенты и разбавители описаны более подробно в данном документе.

В определенных вариантах осуществления, композиция содержит множество полипептидов и/или антител по настоящему изобретению, причем один или несколько полипептидов или антител не содержит остаток лизина на С-терминальном конце тяжелой цепи, СН1-СН3 или полипептида Fc, и при этом один или несколько антител или антигенсвязывающих фрагментов содержит остаток лизина на С-терминальном конце тяжелой цепи, СН1-СН3 или полипептида Fc.

В определенных вариантах осуществления, композиция содержит два или более разных полипептидов или антител в соответствии с настоящим изобретением.

В определенных вариантах осуществления, композиция содержит афукозилированные антитела или полипептиды.

В определенных вариантах осуществления, композиция содержит первый вектор, содержащий первую плазмиду, и второй вектор, содержащий вторую плазмиду, причем первая плазида содержит полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь, VH или VH+CH, и вторая плазида содержит полинуклеотид, кодирующий когнатную легкую цепь, VL или VL+CL антитела. В определенных вариантах осуществления, композиция содержит полинуклеотид (например, мРНК), связанный с пригодным средством доставки или носителем. Примеры средств доставки или носителей для введения человеку включают липидные или полученные из липидов средства доставки, такие как липосома, твердая липидная наночастица, масляная суспензия, субмикронная липидная эмульсия, липидный микропузырек, обращенная липидная мицелла, кохлеарная липосома, липидная микротрубочка, липидный микроцилиндр или липидная наночастица (ЛНЧ) или наномасштабная платформа (см., например, Li *et al. Wiley Interdiscip Rev. Nanomed Nanobiotechnol.* 11(2):e1530 (2019)). Принципы, реагенты и методы конструирования соответствующих мРНК и составления композиций мРНК-ЛНЧ и их доставки описаны, например, в Pardi *et al. (J Control Release 217345-351 (2015))*; Thess *et al. (Mol Ther 23: 1456-1464 (2015))*; Thran *et al. (EMBO Mol Med 9(10):1434-1448 (2017))*; Kose *et al. (Sci. Immunol. 4 eaaw6647 (2019))*; и Sabnis *et al. (Mol. Ther. 26:1509-1519 (2018))*, причем указанные методы, включающие кэпирование, оптимизацию кодонов, модификацию нуклеозидов, очистку мРНК, включение мРНК в стабильные липидные наночастицы (например, ионизируемый катионный липид/фосфатидилхолин/холестерин/ПЭГ-липид; ионизируемый липид: дистеароил-ФХ:холестерин:полиэтиленгликольлипид), и их

подкожное, внутримышечное, интрадермальное, внутривенное, интраперитонеальное и интратрахеальное введение, включены в данный документ посредством ссылки.

### ***Способы и применения***

Также в данном документе предусматриваются способы лечения субъекта с использованием полипептида по настоящему изобретению (например, в виде слитого белка или молекулы-носителя), антитела по настоящему изобретению (например, в виде нацеленного на заболевание агента или молекулы-носителя), или содержащей их композиции, причем субъект имеет, предположительно имеет или подвержен риску заболевания или расстройства. «Лечить», «лечение» или «облегчение» относится к медицинскому ведению заболевания, расстройства или состояния субъекта (например, человека или не являющегося человеком млекопитающего, такого как примат, лошадь, кошка, собака, коза, мышь или крыса). В общем, требуемую дозу или схему лечения, содержащую антитело или композицию по настоящему изобретению, вводят в количестве, достаточном для создания терапевтического или профилактического полезного эффекта. Терапевтический или профилактический/предупредительный полезный эффект включает улучшенный клинический исход; уменьшение или облегчение симптомов, ассоциированных с заболеванием; снижение частоты возникновения симптомов; улучшение качества жизни; более продолжительный статус благополучия по болезни; уменьшение степени заболевания, стабилизацию болезненного состояния; задержку или предотвращение прогрессирования заболевания; ремиссию; выживаемость; увеличенную продолжительность выживания; или любую их комбинацию. В определенных вариантах осуществления, терапевтический или профилактический/предупредительный полезный эффект включает уменьшение или предотвращение госпитализации с целью лечения заболевания или расстройства (т.е., статистически значимым образом). В определенных вариантах осуществления, терапевтический или профилактический/предупредительный полезный эффект включает уменьшение продолжительности госпитализации с целью лечения заболевания или расстройства (т.е., статистически значимым образом). В определенных вариантах осуществления, терапевтический или профилактический/предупредительный полезный эффект включает снижение или устранение необходимости в респираторной поддержке, такой как интубация и/или использование аппарата искусственного дыхания. В определенных вариантах осуществления, терапевтический или профилактический/предупредительный полезный

эффект включает обращение патологии на поздних стадиях заболевания и/или снижение летальности.

«Терапевтически эффективное количество» или «эффективное количество» полипептида, антитела, полинуклеотида, вектора, клетки-хозяина или композиции по настоящему изобретению относится к количеству композиции или молекулы, достаточному для достижения терапевтического эффекта, включая улучшенный клинический исход; уменьшение или облегчение симптомов, ассоциированных с заболеванием; снижение частоты возникновения симптомов; улучшение качества жизни; более продолжительный статус благополучия по болезни; снижение степени заболевания; стабилизацию болезненного состояния; задержку прогрессирования заболевания; ремиссию; выживаемость; или увеличение продолжительности выживания статистически значимым образом. При указании индивидуального активного ингредиента, вводимого отдельно, терапевтически эффективное количество относится к действию этого ингредиента или клетки, экспрессирующей только этот ингредиент. При указании комбинации, терапевтически эффективное количество относится к объединенному количеству активных ингредиентов или объединенному вспомогательному активному ингредиенту с клеткой, экспрессирующей активный ингредиент, который вызывает терапевтический эффект, независимо от того, вводятся ли они периодически, последовательно или одновременно.

Субъекты, которые могут получать лечение по настоящему изобретению, представляют собой, в общем, людей и других приматов, таких как мартышки и человекообразные обезьяны, в целях ветеринарной медицины. Другие модельные организмы, такие как мыши и крысы, могут также получать лечение в соответствии с настоящим изобретением. В любых из вышеназванных вариантов осуществления, субъект может быть человеком. Субъекты могут быть мужского или женского пола и могут иметь любой пригодный возраст, включая младенцев, детей, подростков, взрослых и субъектов пожилого возраста.

В некоторых вариантах осуществления, заболевание или расстройство включает инфекционное заболевание (необязательно вызываемое вирусной, бактериальной, грибковой или паразитарной инфекцией), раковое заболевание, пролиферативное расстройство, нейродегенеративное заболевание, аутоиммунное заболевание, или любую их комбинацию. В дополнительных вариантах осуществления, инфекционное заболевание включает: коронавирусную инфекцию, бетакоронавирусную инфекцию, сарбековирную

инфекцию, эмбековиральную инфекцию, нобекковиральную инфекцию, мербековиральную инфекцию, метапневмовиральную инфекцию, гибековиральную инфекцию, инфекцию SARS-CoV-2, инфекцию вируса гепатита В, инфекцию вируса гепатита D, инфекцию вируса гриппа А, инфекцию вируса гриппа В, инфекцию вируса иммунодефицита человека, респираторную вирусную инфекцию, респираторно-синцитиальную вирусную инфекцию, инфекцию вируса Зика, инфекцию вируса бешенства, инфекцию вируса денге, флавивиральную инфекцию, эболавиральную инфекцию, или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления, заболевание или расстройство включают раковое заболевание. В определенных вариантах осуществления, раковое заболевание включает солидный рак или гематологические злокачественные новообразования. В определенных вариантах осуществления, раковое заболевание включает карциному, саркому, глиому, лимфому, лейкоз, миелому, или любую их комбинацию. В определенных вариантах осуществления, рак включает рак головы и шеи, меланому, рак поджелудочной железы, холангиокарциному, печеночноклеточный рак, рак молочной железы, включая трижды негативный рак молочной железы (TNBC), рак желудка, немелкоклеточный рак легкого, рак предстательной железы, рак пищевода, мезотелиому, мелкоклеточный рак легкого, колоректальный рак, глиобластому, или любую их комбинацию.

В определенных вариантах осуществления, рак включает опухоль Аскина, гроздевидную саркому, хондросаркому, саркому Юинга, PNET (периферическую нейроэктодермальную опухоль), злокачественную гемангиоэндотелиому, злокачественную шванному, остеосаркому, альвеолярную саркому мягких тканей, ангиосаркому, листовидную цистосаркому, взрывающую дерматофибросаркому (DFSP), десмоидную опухоль, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, эпителиоидную саркому, внескелетную хондросаркому, внескелетную остеосаркому, фибросаркому, желудочно-кишечную стромальную опухоль (GIST), гемангиоперицитому, гемангиосаркому, саркому Капоши, лейомиосаркому, липосаркому, лимфангиосаркому, лимфосаркому, недифференцированную плеоморфную саркому, злокачественную опухоль оболочек периферических нервов (MPNST), нейрофибросаркому, рабдомиосаркому, синовиальную саркому, недифференцированную плеоморфную саркому, плоскоклеточную карциному, базальноклеточную карциному, аденокарциному, диффузный рак желудка, випому, холангиокарциному, печеночноклеточную карциному, аденокистозную карциному, почечноклеточную карциному, опухоль Гравитца,

эпендимому, астроцитому, олигодендроглиому, глиому ствола головного мозга, глиому глазного нерва, смешанную глиому, лимфому Ходжкина, В-клеточную лимфому, неходжкинскую лимфому (NHL), лимфому Беркитта, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, иммунобластную крупноклеточную лимфому, В-лимфобластный лейкоз из клеток-предшественников и мантийноклеточную лимфому, макроглобулинемию Вальденстрёма, CD37+ дендритноклеточную лимфому, лимфоплазмоцитарную лимфому, лимфому маргинальной зоны селезёнки, экстранодальную В-клеточную лимфому из клеток краевой зоны лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой (MALT), нодальную В-клеточную лимфому маргинальной зоны, медиастинальную (тимическую) крупноклеточную В-клеточную лимфому, внутрисосудистую крупноклеточную В-клеточную лимфому, первичную выпотную лимфому, Т-клеточную лимфому взрослых, экстранодальную ЕК/Т-клеточную лимфому назального типа, ассоциированную с энтеропатией Т-клеточную лимфому, гепатоспленическую Т-клеточную лимфому, бластную ЕК-клеточную лимфому, синдром Сезари, ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому, анапластическую крупноклеточную лимфому, или любую их комбинацию.

В определенных вариантах осуществления, рак включает солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления, солидная опухоль представляет собой саркому или карциному. В определенных вариантах осуществления, солидную опухоль выбирают из: хондросаркомы; фибросаркомы (фибробластной саркомы); взрывающейся дерматофибросаркомы (DFSP); остеосаркомы; рабдомиосаркомы; саркомы Юинга; желудочно-кишечной стромальной опухоли; лейомиосаркомы; ангиосаркомы (сосудистой саркомы); саркомы Капоши; липосаркомы; плеоморфной саркомы; или синовиальной саркомы. В определенных вариантах осуществления, солидную опухоль выбирают из карциномы легкого (например, аденокарциномы, плоскоклеточной карциномы (эпидермоидной карциномы); плоскоклеточной карциномы; аденокарциномы; аденосквамозной карциномы; анапластической карциномы; крупноклеточной карциномы; мелкоклеточной карциномы; карциномы молочной железы (например, протоковой карциномы *in situ* (неинвазивной), лобулярной карциномы *in situ* (неинвазивной), инвазивной протоковой карциномы, инвазивной лобулярной карциномы, неинвазивной карциномы); карциномы печени (например, печеночноклеточной карциномы, холангиокарцином или рака желчных протоков); крупноклеточной недифференцированной карциномы, бронхоальвеолярной карциномы); карциномы

яичника (например, опухоли поверхностного эпителия и стромы (аденокарциномы) или карциномы эпителия яичника (которая включает серозную опухоль, эндометриоидную опухоль и муцинозную цистаденокарциному), эпидермоидной (плоскоклеточной карциномы), эмбриональной карциномы и хориокарциномы (опухолей зародышевых клеток)); карциномы почки (например, аденокарциномы почки, гипернефромы, переходноклеточной карциномы (почечной лоханки), плоскоклеточной карциномы, карциномы канальцев Беллини, светлоклеточной аденокарциномы, переходноклеточной карциномы, карциноидной опухоли почечной лоханки); карциномы надпочечника (например, аденокортикальной карцинома), карциномы яичка (например, карциномы зародышевых клеток (семиномы, хориокарциномы, эмбриональной карциномы, тератокарциномы), серозной карциномы); карциномы желудка (например, аденокарциномы); карциномы кишечника (например, аденокарциномы двенадцатиперстной кишки); колоректальной карциномы; или карциномы кожи (например, базальноклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы). В определенных вариантах осуществления, солидная опухоль представляет собой карциному яичника, карциному эпителия яичника, аденокарциному шейки матки или мелкоклеточную карциному, карциному поджелудочной железы, колоректальную карциному (например, аденокарциному или плоскоклеточную карциному), карциному легкого, карциному протоков молочной железы или аденокарциному предстательной железы.

В определенных вариантах осуществления, лечение проводят как профилактику в период, близкий к моменту экспозиции. В определенных вариантах осуществления, лечение назначается субъекту с заболеванием от слабой до умеренной степени, что может осуществляться в амбулаторных условиях. В определенных вариантах осуществления, лечение назначается субъекту с заболеванием от умеренной до тяжелой степени, таким как требующее госпитализации.

В некоторых вариантах осуществления, раковое заболевание или пролиферативное расстройство включает солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления, раковое заболевание или пролиферативное расстройство включает гематологические злокачественные новообразования.

Таким образом, типичные пути введения раскрытых в данном документе композиций включают, без ограничений, пероральный, местный, трансдермальный, путем ингаляции, парентеральный, сублингвальный, буккальный, ректальный, вагинальный и

интраназальный. Термин «парентеральный», при использовании в данном документе, включает подкожные инъекции, методы внутривенной, внутримышечной, внутригрудинной инъекции или инфузии. В определенных вариантах осуществления, введение включает введение путем, который выбирают из перорального, внутривенного, парентерального, внутрижелудочного, интраплеврального, внутрилегочного, интаректального, интрадермального, интраперитонеального, внутриопухолевого, подкожного, местного, трансдермального, интрацистернального, интратекального, интраназального и внутримышечного. В конкретных вариантах осуществления, способ включает пероральное введение субъекту полипептида, антитела, полинуклеотида, вектора, клетки-хозяина или композиции.

Фармацевтические композиции в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения составлены таким образом, чтобы обеспечить биодоступность содержащихся в них активных ингредиентов после введения композиции пациенту. Композиции, предназначенные для введения субъекту или пациенту, могут представлять собой одну или несколько единиц дозирования, причем, например, таблетка может быть единичной дозированной лекарственной формой, а контейнер описанных в данном документе полипептида или антитела или антигенсвязывающего фрагмента в форме аэрозоля может содержать множество единиц дозирования. Фактические методы приготовления таких лекарственных форм известны или будут очевидны специалистам в данной области техники, см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000). Композиция, предназначенная для введения, будет, в любом случае, содержать эффективное количество антитела или антигенсвязывающего фрагмента, полинуклеотида, вектора, клетки-хозяина или композиции по настоящему изобретению, для лечения заболевания или состояния, представляющего интерес в соответствии с описанием, приведенным в данном документе.

Композиция может иметь твердую или жидкую форму. В некоторых вариантах осуществления, носитель (носители) являются дисперсными, поэтому композиции имеют, например, форму таблетки или порошка. Носитель (носители) может быть жидким, причем композиции являются, например, масляными для перорального применения, жидкостями для инъекции или аэрозолем, который используется, например, при введении ингаляцией. Фармацевтическая композиция, предназначенная для перорального приема, предпочтительно находится в твердой или жидкой форме, причем полутвердые,

полужидкие, суспензионные и гелеобразные формы относятся к формам, рассматриваемым в данном документе как твердые или жидкие.

В случае твердой композиции для перорального приема фармацевтическая композиция может быть составлена в виде порошка, гранул, прессованной таблетки, пилюли, капсулы, жевательной резинки, облатки и т.п. Такая твердая композиция будет типично содержать один или несколько инертных разбавителей или съедобных носителей. Кроме того, может присутствовать что-то одно или несколько из следующего: связующие, такие как карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза, микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; эксципиенты, такие как крахмал, лактоза или декстрины, разрыхлители, такие как альгиновая кислота, альгинат натрия, примогель (Primogel), кукурузный крахмал и т.п.; смазывающие вещества, такие как стеарат магния или стеротекс (Sterotex); скользящие вещества, такие как коллоидный диоксид кремния; подсластители, такие как сахароза или сахарин; вкусовое вещество, такое как перечная мята, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор; и красящее вещество. Если композиция имеет форму капсулы, например, желатиновой капсулы, она может содержать, дополнительно к материалам указанного выше типа, жидкий носитель, такой как полиэтиленгликоль или масло.

Композиция может иметь форму жидкости, например, эликсира, сиропа, раствора, эмульсии или суспензии. Жидкость может быть предназначена для перорального введения или для доставки путем инъекции, в качестве двух примеров. Предпочтительные композиции, предназначенные для перорального введения, содержат, дополнительно к соединениям по настоящему изобретению, что-то одно или несколько из подсластителя, консервантов, красителя/красящего вещества и усилителя вкуса. В композицию, предназначенную для введения путем инъекции, может быть включено что-то одно или несколько из поверхностно-активного вещества, консерванта, смачивающего агента, диспергента, суспендирующего агента, буфера, стабилизатора и изотонического агента.

Жидкие фармацевтические композиции, независимо от того, являются ли они растворами, суспензиями или другими схожими формами, могут включать один или несколько из следующих адьювантов: стерильные разбавители, такие как вода для инъекций, солевой раствор, предпочтительно физиологический солевой раствор, раствор Рингера, изотонический хлорид натрия, нелетучие масла, такие как синтетически моно- или диглицериды, которые могут служить растворителем или суспендирующей средой, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие растворители;

антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабен;  
антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты и агенты регуляции тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы, изготовленные из стекла или пластика.

Физиологический солевой раствор является предпочтительным адьювантом.

Фармацевтическая композиция для инъекций предпочтительно является стерильной.

Жидкая композиция, предназначенная для парентерального либо перорального введения, должна содержать раскрытое в данном документе количество полипептида, антитела, полинуклеотида, вектора, клетки-хозяина или композиции, для получения пригодной дозировки. Типично, это количество составляет по меньшей мере 0,01% полипептида или антитела в композиции. Такое количество, предназначенное для перорального введения, может изменяться от 0,1 до примерно 70% от веса композиции. Некоторые пероральные фармацевтические композиции содержат от примерно 4% до примерно 75% полипептида или антитела. В определенных вариантах осуществления, фармацевтические композиции и препараты в соответствии с настоящим изобретением готовят таким образом, чтобы парентеральная единица дозирования содержала от 0,01 до 10% мас. полипептида или антитела до разбавления.

Композиция может быть предназначена для местного введения, и в этом случае носитель может представлять собой раствор, эмульсию, мазь или гелевую основу. Основа, например, может включать что-то одно или несколько из следующего: вазелин, ланолин, полиэтиленгликоли, пчелиный воск, минеральное масло, разбавители, такие как вода и спирт, и эмульгаторы и стабилизаторы. Загустители могут присутствовать в композиции для местного введения. Композиция, предназначенная для трансдермального введения, может включать трансдермальный пластырь или устройство для ионофореза.

Фармацевтическая композиция может быть предназначена для ректального введения, в форме, например, суппозитория, который плавится в прямой кишке и высвобождает лекарственный препарат. Композиция для ректального введения может содержать маслянистую основу в качестве пригодного нераздражающего эксципиента. Такие основы включают, без ограничений, ланолин, масло какао и полиэтиленгликоль.

Композиция может включать различные материалы, которые модифицируют физическую форму твердой или жидкой единицы дозирования. Например, композиция

может включать материалы, которые образуют внешнюю оболочку вокруг активных ингредиентов. Материалы, которые образуют внешнюю оболочку, типично являются инертными, и могут быть выбраны, например, из сахара, шеллака и других агентов энтеросолюбивых покрытий. Альтернативно, активные ингредиенты могут быть заключены в желатиновую капсулу. Композиция в твердой или жидкой форме может включать агент, который связывается с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению, и тем самым способствует доставке соединения.

Подходящие агенты, которые могут выступать в этом качестве, включают моноклональные или поликлональные антитела, один или несколько белков или липосомы. Композиция может состоять по существу из лекарственных форм, которые могут быть введены в виде аэрозоля. Термин аэрозоль используется для обозначения различных систем в диапазоне от имеющих коллоидную природу до систем, состоящих из упаковок под давлением. Доставка может осуществляться с помощью сжиженного или сжатого газа или пригодной насосной системы, которая дозирует активные ингредиенты. Аэрозоли могут доставляться в виде однофазных, двухфазных или трехфазных систем для доставки активного ингредиента (ингредиентов). Доставка аэрозоля включает необходимый контейнер, приводные устройства, клапана, субконтейнеры и т.п., которые вместе могут образовывать набор. Рядовой специалист в данной области техники сможет определить предпочтительные аэрозоли, не прибегая к излишним экспериментам.

Следует понимать, что композиции по настоящему изобретению также охватывают молекулы-носители для полинуклеотидов, как описано в данном документе (например, липидные наночастицы, наномасштабные платформы для доставки и т.п.).

Фармацевтические композиции могут быть приготовлены методами, хорошо известными в области фармацевтики. Например, композиция, предназначенная для введения путем инъекции, может быть приготовлена путем объединения композиции, которая содержит полипептид или антитело, как описано в данном документе и, необязательно, одну или несколько солей, буферов и/или стабилизаторов, со стерильной дистиллированной водой для образования раствора. Может быть добавлено поверхностно-активное вещество для облегчения образования гомогенного раствора или суспензии. Поверхностно-активные вещества представляют собой соединения, которые нековалентно взаимодействуют с пептидной композицией, облегчая растворение или образование гомогенной суспензии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в водной системе доставки.

В общем, соответствующая доза и схема лечения обеспечивают композицию (композиции) в количестве, достаточном для обеспечения терапевтического и/или профилактического полезного эффекта (такого как описанный в данном документе, включая улучшенный клинический исход (например, снижение частоты, продолжительности или тяжести диареи или связанного с ней обезвоживания, или воспаления, или большая продолжительность периода без признаков заболевания и/или общая выживаемость, или уменьшение тяжести симптома). Для профилактического применения, доза должна быть достаточной для предотвращения, задержки начала, или уменьшения тяжести заболевания, ассоциированного с болезнью или расстройством. Профилактический эффект композиций, введенных в соответствии со способами, описанными в данном документе, может быть определен путем проведения доклинических (включая *in vitro* и *in vivo* исследования на животных) и клинических исследований и анализа полученных данных с использованием соответствующих статистических, биологических и клинических способов и методик, которые все могут быть легко осуществлены специалистом в данной области.

Композиции вводят в эффективном количестве, которое будет меняться в зависимости от различных факторов, включая активность конкретного используемого соединения; метаболическую стабильность и продолжительность действия соединения; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол, и питание субъекта; режим и время введения; скорость выведения; комбинацию лекарственных средств; тяжесть конкретного расстройства или состояния; и субъекта, получающего лечение. В определенных вариантах осуществления, после проведения терапий в соответствии с рецептурами композиций и способами по настоящему изобретению, тестируемые субъекты будут демонстрировать снижение на величину от примерно 10% до примерно 99% одного или нескольких симптомов, ассоциированных с заболеванием или расстройством, лечение которых проводится, по сравнению с получающими плацебо или другими пригодными контрольными субъектами.

Например, в общем, терапевтически эффективная суточная доза антитела составляет (для млекопитающего весом 70 кг) от примерно 0,001 мг/кг (*m.e.*, 0,07 мг) до примерно 100 мг/кг (*m.e.*, 7,0 г); предпочтительно, терапевтически эффективная доза составляет (для млекопитающего весом 70 кг) от примерно 0,01 мг/кг (*m.e.*, 0,7 мг) до примерно 50 мг/кг (*m.e.*, 3,5 г); более предпочтительно, терапевтически эффективная доза составляет (для млекопитающего весом 70 кг) от примерно 1 мг/кг (*m.e.*, 70 мг) до

примерно 25 мг/кг (*m.e.*, 1,75 г). Для полипептидов, полинуклеотидов, векторов, клеток-хозяев и родственных композиций по настоящему изобретению, терапевтически эффективная доза может отличаться от антитела.

В определенных вариантах осуществления, способ включает введение полипептида, антитела, полинуклеотида, вектора, клетки-хозяина или композиции субъекту 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз или больше.

В определенных вариантах осуществления, способ включает введение полипептида, антитела, полинуклеотида, вектора, клетки-хозяина или композиции субъекту множество раз, причем второе или последующее введение выполняется через примерно 6, примерно 7, примерно 8, примерно 9, примерно 10, примерно 11, примерно 12, примерно 24, примерно 48, примерно 74, примерно 96 часов или больше, после первого или предшествующего введения, соответственно.

В определенных вариантах осуществления, способ включает введение полипептида, антитела, полинуклеотида, вектора, клетки-хозяина или композиции субъекту множество раз, причем второе или последующее введение выполняется через примерно 1 неделю, примерно 2 недели, примерно 1 месяц, примерно 2 месяца, примерно 3 месяца, примерно 4 месяца, примерно 5 месяцев, примерно 6 месяцев, примерно 7 месяцев, примерно 8 месяцев, примерно 9 месяцев, примерно 10 месяцев, примерно 11 месяцев, примерно 12 месяцев или больше, после первого или предшествующего введения, соответственно.

В определенных вариантах осуществления, способ включает введение антитела, антигенсвязывающего фрагмента, полинуклеотида, вектора, клетки-хозяина или композиции по меньшей мере один раз до того, как субъект будет инфицирован патогеном, таким как вирус.

Композиции, содержащие полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетку-хозяина или композицию по настоящему изобретению, могут также быть введены одновременно с, до, или после введения одного или нескольких других терапевтических агентов. Такая комбинированная терапия может включать введение единой фармацевтической дозированной лекарственной формы, которая содержит соединение по изобретению и один или несколько дополнительных активных агентов, а также введение композиций, содержащих полипептид или антитело по настоящему изобретению и каждый активный агент в их собственной отдельной дозированной лекарственной форме. Например, полипептид или антитело, описанные в данном документе, и другой активный

агент могут быть введены пациенту вместе в одной пероральной дозированной композиции, такой как таблетка или капсула, или каждый агент вводят в отдельных пероральных дозированных композициях. Аналогично, полипептид или антитело, описанные в данном документе, и другой активный агент могут быть введены субъекту вместе в одной парентеральной дозированной лекарственной форме, такой как в солевом растворе или другом физиологически приемлемом растворе, или каждый агент вводят в отдельных парентеральных дозированных лекарственных формах. В тех случаях, когда используются отдельные дозированные лекарственные формы, композиции, содержащие полипептид или антитело и один или несколько дополнительных активных агентов, могут быть введены по существу в одно и то же время, *т.е.*, одновременно, или в разные моменты времени с некоторыми интервалами, *т.е.*, последовательно и в любом порядке; подразумевается, что комбинированная терапия включает все такие схемы.

В определенных вариантах осуществления, предусматривается комбинированная терапия, которая состоит из одного или нескольких полипептидов или антител (или одной или нескольких нуклеиновых кислот, клеток-хозяев, векторов или композиций) по настоящему изобретению и одного или нескольких противовоспалительных агентов и/или одного или нескольких противовирусных агентов. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько противовоспалительных агентов включают кортикостероид, такой как, например, дексаметазон, преднизон и т.п. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько противовоспалительных агентов включают антагонист цитокина, такой как, например, антитело, которое связывается с IL6 (такое как силтуксимаб), или с IL-6R (такое как тоцилизумаб), или с IL-1 $\beta$ , IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, FGF, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IP-10, MCP-1, MIP-1A, MIP1-B, PDGR, TNF- $\alpha$  или VEGF. В некоторых вариантах осуществления используются противовоспалительные агенты, такие как руксолитиниб и/или анакинра. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько противовирусных агентов включают нуклеотидные аналоги или пролекарства нуклеотидных аналогов, такие как, например, ремдесивир, софосбувир, ацикловир и зидовудин. В конкретных вариантах осуществления, противовирусный агент включает лопинавир, ритонавир, фавипиравир или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, комбинированная терапия включает леронлимаб. Противовоспалительные агенты для использования в комбинированной терапии по настоящему изобретению также включают нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAIDS). Следует понимать, что в такой комбинированной терапии, один или несколько

полипептидов или антител (или одна или несколько нуклеиновых кислот, клеток-хозяев, векторов или композиций) и один или несколько противовоспалительных агентов и/или один или несколько противовирусных агентов могут быть введены в любом порядке и любой последовательности, или вместе.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид или антитело (или одна или несколько нуклеиновых кислот, клеток-хозяев, векторов или композиций) вводят субъекту, который ранее получал один или несколько противовоспалительных агентов и/или один или несколько противовирусных агентов. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько противовоспалительных агентов и/или один или несколько противовирусных агентов вводят субъекту, который ранее получал антитело (или одну или несколько нуклеиновых кислот, клеток-хозяев, векторов или композиций).

В родственном аспекте, предусматриваются применения раскрытых в данном документе полипептидов, антител, полинуклеотидов, векторов, клеток-хозяев и композиций.

В определенных вариантах осуществления предусматривается полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетка-хозяин или композиция для использования в способе лечения заболевания или расстройства у субъекта.

В определенных вариантах осуществления предусматривается полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетка-хозяин или композиция для использования в способе производства или приготовления медикамента для лечения заболевания или расстройства у субъекта.

Также в данном документе предусматриваются способы применения полипептида, антитела, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или композиции по настоящему изобретению в диагностике заболевания или расстройства (например, у человека или в образце, полученном от человека). Способы диагностики (например, *in vitro*, *ex vivo*) могут включать введение полипептида или антитела в контакт с образцом. Такие образцы могут быть выделены у субъекта, например, выделенный образец ткани, взятый из, например, носовых ходов, синусных полостей, слюнных желез, легкого, печени, поджелудочной железы, почки, уха, глаза, плаценты, пищеварительного тракта, сердца, яичников, гипофиза, надпочечника, щитовидной железы, головного мозга, кожи или крови. Способы диагностики могут также включать детектирование комплекса антиген/антитело, в частности, после введения в контакт антитела или фрагмента антитела с образцом. Такая стадия детектирования может проводиться в лаборатории, *m.e.* без

какого-либо контакта с организмом человека или животного. Примеры способов детектирования хорошо известны специалистам в данной области техники и включают, например, ИФА (твердофазный иммуноферментный анализ), включая прямой, непрямой и сэндвич-вариант ИФА.

Настоящее изобретение также предусматривает следующие неограничительные перечисленные варианты осуществления.

Вариант осуществления 1. Полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмент,

причем вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU и лейцин (L) в положении 300 по EU.

Вариант осуществления 2. Полипептид по Варианту осуществления 1, причем вариант и, необязательно, полипептид, имеет повышенное связывание с FcγRIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида с FcγRIIa человека, при этом, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

Вариант осуществления 3. Полипептид по Варианту осуществления 2, причем повышенное связывание с FcγRIIa человека включает по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, по меньшей мере 10-кратно, по меньшей мере 11-кратно, по меньшей мере 12-кратно, по меньшей мере 13-кратно, по меньшей мере 14-кратно, по меньшей мере 15-кратно, по меньшей мере 16-кратно, по меньшей мере 17-кратно, или по меньшей мере 18-кратно увеличенное связывание с FcγRIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с FcγRIIa человека.

Вариант осуществления 4. Полипептид по Варианту осуществления 2 или Варианта осуществления 3, причем FcγRIIa человека содержит H131 и, необязательно, повышенное связывание с H131 FcγRIIa человека включает по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, или по меньшей мере 10-кратно, по меньшей мере 11-кратно, по меньшей мере 12-кратно, по меньшей мере 13-кратно, по меньшей мере 14-кратно, по меньшей мере 15-кратно, по меньшей мере 16-кратно, по меньшей мере 17-

кратно, или по меньшей мере 18-кратно увеличенное связывание с H131 FcγRIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с H131 FcγRIIa человека.

Вариант осуществления 5. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 2-4, причем FcγRIIa человека содержит R131 и, необязательно, повышенное связывание с R131 FcγRIIa человека включает по меньшей мере 4-кратно увеличенное связывание с R131 FcγRIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с R131 FcγRIIa человека.

Вариант осуществления 6. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 2-5, причем

(1) отношение (i) связывания варианта или полипептида с FcγRIIa человека к (ii) связыванию варианта или полипептида, соответственно, с FcγRIIb человека, является большим, чем

(2) отношение (iii) связывания референсного полипептида с FcγRIIa человека к (iv) связыванию референсного полипептида с FcγRIIb человека, причем референсный полипептид содержит полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент.

Вариант осуществления 7. Полипептид по Варианту осуществления 6, причем FcγRIIa человека содержит H131.

Вариант осуществления 8. Полипептид по Варианту осуществления 6 или 7, причем FcγRIIa человека содержит R131.

Вариант осуществления 9. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 6-8, причем отношение (1) является по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, по меньшей мере 10-кратно, по меньшей мере 11-кратно, по меньшей мере 12-кратно, по меньшей мере 13-кратно, по меньшей мере 14-кратно, по меньшей мере 15-кратно, по меньшей мере 16-кратно, или по меньшей мере 17-кратно большим, чем отношение (2).

Вариант осуществления 10. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 1-9, дополнительно содержащий пролин (P) в положении 292 по EU.

Вариант осуществления 11. Полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмент,

причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, валин (V) в положении 328 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 295 по EU.

Вариант осуществления 12. Полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида шарнир-CH2 IgG; или (ii) полипептида шарнир-Fc IgG или его фрагмент,

причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, аланин (A) в положении 230 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 295 по EU.

Вариант осуществления 13. Полипептид, содержащий вариант: полипептида Fc IgG или его фрагмент,

причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, пролин (P) в положении 292 по EU и аспарагин (N) в положении 377 по EU.

Вариант осуществления 14. Полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмент,

причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, аланин (A) в положении 334 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 295 по EU.

Вариант осуществления 15. Полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмент,

причем указанный вариант содержит серин (S) в положении 236 по EU, пролин (P) в положении 292 по EU и лейцин (L) в положении 300 по EU.

Вариант осуществления 16. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 11-15, причем указанный вариант и, необязательно, полипептид, имеет повышенное связывание с FcγRIIIa человека и/или имеет пониженное связывание с FcγRIIIb человека, по сравнению со связыванием референсного полипептида с FcγRIIIa человека или FcγRIIIb человека, соответственно,

при этом, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

Вариант осуществления 17. Полипептид по Варианту осуществления 16, причем повышенное связывание с FcγRIIIa человека включает более чем 1-кратно, по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 3-кратно, по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, или по меньшей мере 10-кратно увеличенное связывание с FcγRIIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с FcγRIIIa человека.

Вариант осуществления 18. Полипептид по Варианту осуществления 16 или Варианта осуществления 17, причем Fc $\gamma$ RIIIa человека содержит H131 и, необязательно, повышенное связывание с H131 Fc $\gamma$ RIIIa человека включает по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, или по меньшей мере 10-кратно увеличенное связывание с H131 Fc $\gamma$ RIIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с H131 Fc $\gamma$ RIIIa человека.

Вариант осуществления 19. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 16-18, причем Fc $\gamma$ RIIIa человека содержит R131 и, необязательно, повышенное связывание с R131 Fc $\gamma$ RIIIa человека включает более чем 1-кратно, по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 3-кратно, по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, или по меньшей мере 10-кратно увеличенное связывание с R131 Fc $\gamma$ RIIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с R131 Fc $\gamma$ RIIIa человека.

Вариант осуществления 20. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 16-19, причем пониженное связывание с Fc $\gamma$ RIIIb человека включает менее чем 0,9-кратное, менее чем 0,8-кратное, менее чем 0,7-кратное, менее чем 0,6-кратное, или между 0,5-кратным и 0,9-кратным, связывание референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с Fc $\gamma$ RIIIb человека.

Вариант осуществления 21. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 1-20, причем

(1) отношение (i) связывания варианта или полипептида с Fc $\gamma$ RIIIa человека к (ii) связыванию варианта или полипептида, соответственно, с Fc $\gamma$ RIIIb человека, является большим, чем

(2) отношение (iii) связывания референсного полипептида с Fc $\gamma$ RIIIa человека к (iv) связыванию референсного полипептида с Fc $\gamma$ RIIIb человека, причем референсный полипептид содержит полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, при этом, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

Вариант осуществления 22. Полипептид по Варианту осуществления 21, причем FcγRIIIa человека содержит H131.

Вариант осуществления 23. Полипептид по Варианту осуществления 21 или 22, причем FcγRIIIa человека содержит R131.

Вариант осуществления 24. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 21-23, причем отношение (1) является более чем 1-кратно, по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 3-кратно, по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, по меньшей мере 10-кратно, по меньшей мере 11-кратно, по меньшей мере 12-кратно, по меньшей мере 13-кратно, или по меньшей мере 14-кратно большим, чем отношение (2).

Вариант осуществления 25. Полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмент, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, пролин (P) в положении 292 по EU и лейцин (L) в положении 300 по EU.

Вариант осуществления 26. Полипептид по Варианту осуществления 25, причем указанный вариант и, необязательно, полипептид, имеет повышенное связывание с FcγRIIIa человека,

по сравнению со связыванием референсного полипептида с FcγRIIIa человека, при этом, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

Вариант осуществления 27. Полипептид по Варианту осуществления 26, причем повышенное связывание с FcγRIIIa человека включает по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 3-кратно, по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, по меньшей мере 10-кратно, по меньшей мере 11-кратно, по меньшей мере 12-кратно, по меньшей мере 13-кратно, или по меньшей мере 14-кратно увеличенное связывание с FcγRIIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с FcγRIIIa человека.

Вариант осуществления 28. Полипептид по Варианту осуществления 26 или Варианта осуществления 27, причем FcγRIIIa человека содержит H131 и, необязательно,

повышенное связывание с H131 FcγRIIIa человека включает по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 3-кратно, по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, по меньшей мере 10-кратно, по меньшей мере 11-кратно, по меньшей мере 12-кратно, по меньшей мере 13-кратно, или по меньшей мере 14-кратно увеличенное связывание с H131 FcγRIIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с H131 FcγRIIIa человека.

Вариант осуществления 29. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 25-28, причем FcγRIIIa человека содержит R131 и, необязательно, повышенное связывание с H131 FcγRIIIa человека включает по меньшей мере 2-кратно увеличенное связывание с R131 FcγRIIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с R131 FcγRIIIa человека.

Вариант осуществления 30. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 25-29, причем

(1) отношение (i) связывания варианта или полипептида с FcγRIIIa человека к (ii) связыванию варианта или полипептида, соответственно, с FcγRIIIb человека, является большим, чем

(2) отношение (iii) связывания референсного полипептида с FcγRIIIa человека к (iv) связыванию референсного полипептида с FcγRIIIb человека, при этом референсный полипептид содержит полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, при этом, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

Вариант осуществления 31. Полипептид по Варианту осуществления 30, причем FcγRIIIa человека содержит H131.

Вариант осуществления 32. Полипептид по Варианту осуществления 30 или 31, причем FcγRIIIa человека содержит R131.

Вариант осуществления 33. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 30-32, причем отношение (1) является по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 3-кратно, по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, по

меньшей мере 10-кратно, по меньшей мере 11-кратно, по меньшей мере 12-кратно, по меньшей мере 13-кратно, по меньшей мере 14-кратно, или по меньшей мере 15-кратно большим, чем отношение (2).

Вариант осуществления 34. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 25-33, причем указанный вариант имеет повышенное связывание с FcγRIIIa человека, по сравнению со связыванием референсного полипептида с FcγRIIIa человека, при этом, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

Вариант осуществления 35. Полипептид по Варианту осуществления 34, причем FcγRIII человека содержит V158, F158, или оба.

Вариант осуществления 36. Полипептид по Варианту осуществления 34 или 35, причем повышенное связывание с FcγRIIIa человека включает более чем 2-кратно, по меньшей мере 2,1-кратно, по меньшей мере 2,2-кратно, по меньшей мере 2,3-кратно, по меньшей мере 2,4-кратно, по меньшей мере 2,5-кратно, по меньшей мере 2,6-кратно, по меньшей мере 2,7-кратно, по меньшей мере 2,8-кратно, по меньшей мере 2,9-кратно, по меньшей мере 3,0-кратно, по меньшей мере 3,1-кратно, по меньшей мере 3,2-кратно, по меньшей мере 3,3-кратно, по меньшей мере 3,4-кратно, по меньшей мере 3,5-кратно, по меньшей мере 3,6-кратно, или по меньшей мере 3,7-кратно увеличенное связывание с FcγRIIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с FcγRIIIa человека.

Вариант осуществления 37. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 25-36, причем указанный вариант и, необязательно, полипептид, способен связываться с компонентом 1q (C1q) комплемента человека,

при этом, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

Вариант осуществления 38. Полипептид, содержащий вариант полипептида Fc IgG, причем вариант содержит серин (S) в положении 236 по EU, валин (V) в положении 420 по EU, глутаминовую кислоту (E) в положении 446 по EU и треонин (T) в положении 309 по EU.

Вариант осуществления 39. Полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU и пролин (P) в положении 292 по EU.

Вариант осуществления 40. Полипептид по Варианту осуществления 38 или 39, причем указанный вариант и, необязательно, полипептид, имеет пониженное связывание с FcγRIIb человека

по сравнению со связыванием референсного полипептида с FcγRIIb человека, при этом, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

Вариант осуществления 41. Полипептид по Варианту осуществления 40, причем пониженное связывание с FcγRIIb человека включает менее чем 0,9-кратное, менее чем 0,8-кратное, менее чем 0,7-кратное, менее чем 0,6-кратное, менее чем 0,5-кратное, или менее чем 0,4-кратное по сравнению со связыванием референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с FcγRIIb человека.

Вариант осуществления 42. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 38-41, причем указанный вариант и, необязательно, полипептид, имеет повышенное связывание с FcγRIIa человека

по сравнению со связыванием референсного полипептида с FcγRIIa человека, при этом, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

Вариант осуществления 43. Полипептид по Варианту осуществления 42, причем повышенное связывание с FcγRIIa человека включает более чем 1-кратно, по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 3-кратно, по меньшей мере 4-кратно, или по меньшей мере 5-кратно увеличенное связывание с FcγRIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с FcγRIIa человека.

Вариант осуществления 44. Полипептид по Варианту осуществления 42 или 43, причем FcγRIIa человека содержит H131.

Вариант осуществления 45. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 42-44, причем FcγRIIa человека содержит R131.

Вариант осуществления 46. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 38-45, причем

(1) отношение (i) связывания варианта или полипептида с FcγRIIIa человека к (ii) связыванию варианта или полипептида, соответственно, с FcγRIIIb человека, является большим, чем

(2) отношение (iii) связывания референсного полипептида с FcγRIIIa человека к (iv) связыванию референсного полипептида с FcγRIIIb человека, при этом референсный полипептид содержит полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, при этом, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

Вариант осуществления 47. Полипептид по Варианту осуществления 46, причем FcγRIIIa человека содержит H131.

Вариант осуществления 48. Полипептид по Варианту осуществления 46 или 47, причем FcγRIIIa человека содержит R131.

Вариант осуществления 49. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 46-48, причем отношение (1) является по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 3-кратно, по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 10-кратно, по меньшей мере 11-кратно, или по меньшей мере 12-кратно большим, чем отношение (2).

Вариант осуществления 50. Полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG,

причем указанный вариант содержит пролин (P) в положении 292 по EU и лейцин (L) в положении 300 по EU, и при этом, необязательно, вариант и, дополнительно необязательно, полипептид, имеет повышенное связывание с FcγRIIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида с FcγRIIIa человека, причем, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

Вариант осуществления 51. Полипептид по Варианту осуществления 50, причем FcγRIIIa человека содержит V158, F158, или оба, и при этом повышенное связывание с FcγRIIIa человека включает по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 4,5-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 5,1-кратно, или по меньшей мере 5,2-кратно увеличенное связывание по сравнению со связыванием референсного полипептида,

содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с Fc $\gamma$ RIIa человека.

Вариант осуществления 52. Полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмент, причем указанный вариант содержит лейцин (L) в положении 300 по EU.

Вариант осуществления 53. Полипептид, содержащий вариант: полипептида Fc IgG или его фрагмент,

причем указанный вариант содержит лизин (K) в положении 345 по EU, серин (S) в положении 236 по EU, тирозин (Y) в положении 235 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 267 по EU.

Вариант осуществления 54. Полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида шарнир-CH2 IgG или (ii) полипептида шарнир-Fc IgG или его фрагмент,

причем указанный вариант содержит аргинин (R) в положении 272 по EU, треонин (T) в положении 309 по EU, тирозин (Y) в положении 219 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 267 по EU.

Вариант осуществления 55. Полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмент,

причем указанный вариант содержит тирозин (Y) или триптофан (W) в положении 236 по EU.

Вариант осуществления 56. Полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмент, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, при этом полипептид CH2 IgG согласно (i) или полипептид Fc IgG или его фрагмент согласно (ii) и, необязательно, полипептид, является афукозилированным,

при этом, дополнительно необязательно, вариант содержит лейцин (L) в положении 330 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 332 по EU, при этом, еще дополнительно необязательно, вариант не содержит аспарагиновую кислоту (D) в положении 239 по EU и, еще дополнительно необязательно, содержит серин (S) в положении 239 по EU.

Вариант осуществления 57. Полипептид, содержащий вариант: полипептида Fc IgG или его фрагмент,

причем указанный вариант содержит

(1) лейцин (L) в положении 243 по EU, глутаминовую кислоту (E) в положении 446 по EU, лейцин (L) в положении 396 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 267 по EU; или

(2) аланин (A) в положении 236 по EU, аспарагиновую кислоту (D) в положении 239 по EU, глутаминовую кислоту (E) в положении 332 по EU, лейцин (L) в положении 428 по EU и серин (S) или аланин (A) в положении 434 по EU.

Вариант осуществления 58. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 50-57, причем полипептид имеет повышенное связывание с C1q человека

по сравнению со связыванием референсного полипептида с C1q человека, при этом, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

Вариант осуществления 59. Полипептид по Варианту осуществления 58, причем повышенное связывание с C1q человека включает более чем 1-кратно, по меньшей мере 1,5-кратно, по меньшей мере 1,75-кратно, по меньшей мере 1,9-кратно, по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 2,1-кратно, по меньшей мере 2,2-кратно, по меньшей мере 2,3-кратно, по меньшей мере 2,4-кратно, по меньшей мере 2,5-кратно, по меньшей мере 2,6-кратно, по меньшей мере 2,7-кратно, по меньшей мере 2,8-кратно, по меньшей мере 2,9-кратно, по меньшей мере 3,0-кратно, по меньшей мере 3,1-кратно, по меньшей мере 3,2-кратно, по меньшей мере 3,3-кратно, по меньшей мере 3,4-кратно, по меньшей мере 3,5-кратно, по меньшей мере 3,6-кратно, по меньшей мере 3,7-кратно, по меньшей мере 3,8-кратно, по меньшей мере 3,9-кратно, по меньшей мере 4,0-кратно, по меньшей мере 4,1-кратно, или по меньшей мере 4,15-кратно увеличенное связывание с C1q человека по сравнению со связыванием референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с C1q человека.

Вариант осуществления 60. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 1-59, который:

- (i) способен связываться с Fc $\gamma$ RIIIa человека, причем Fc $\gamma$ RIIIa человека содержит V158, F158, или оба;
- (ii) способен связываться с Fc $\gamma$ RIIIb человека;
- (iii) способен связываться с FcRn человека, необязательно при pH 6;
- (iv) способен связываться с компонентом Iq (C1q) комплемента человека;

(v) имеет более высокую  $T_m$  и/или может продуцироваться с более высоким титром по сравнению с

- (1) референсным полипептидом, содержащим полипептид Fc IgG1 человека, содержащий аминокислотные замены G236A, S239D, A330L и I330E (нумерация EU) и, необязательно, не содержащий каких-либо других аминокислотных замен по сравнению с полипептидом Fc IgG1 человека дикого типа,
- (2) референсным полипептидом, содержащим полипептид Fc IgG1 человека, содержащий аминокислотные замены G236A, A330L и I330E (нумерация EU) и, необязательно, дополнительно содержащий мутации M428L и N434S или мутации M428L и N434A и/или не содержащий каких-либо других аминокислотных замен и/или не содержащий S239D, по сравнению с полипептидом Fc IgG1 человека дикого типа,
- (3) референсным полипептидом, содержащим полипептид Fc IgG1 человека, содержащий аминокислотные замены G236A или G236S (нумерация EU) и, необязательно, не содержащий каких-либо других аминокислотных замен по сравнению с полипептидом Fc IgG1 человека дикого типа, и/или
- (4) референсным полипептидом, содержащим полипептид Fc IgG1 человека, содержащий аминокислотные замены A330L и I332E (нумерация EU) и, необязательно, не содержащий каких-либо других аминокислотных замен по сравнению с полипептидом Fc IgG1 человека дикого типа;

(vi) способен стимулировать сигнализацию через Fc $\gamma$ Ra в клетке-хозяине, причем, необязательно, (a) сигнализация необязательно является повышенной по сравнению с сигнализацией, стимулируемой референсным полипептидом и/или (b) Fc $\gamma$ Ra включает H131 Fc $\gamma$ RIIa, R131 Fc $\gamma$ RIIa, V158 Fc $\gamma$ RIIIa, F158 Fc $\gamma$ RIIIa, или любую их комбинацию;

(vii) по меньшей мере в составе антитела способен стимулировать антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦТ);

(viii) по меньшей мере в составе антитела способен стимулировать антитело-зависимый фагоцитоз (АЗКФ);

(ix) по меньшей мере в составе антитела способен стимулировать комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ);

(x) по меньшей мере в составе антитела способен образовывать иммунный комплекс; или

(xi) любую комбинацию (i)-(x).

Вариант осуществления 61. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 1-60, причем указанный полипептид содержит антитело и антитело является способным на любое одно или несколько из следующего:

(i) увеличение специфического лизиса (например, посредством АЗКЦТ) естественными киллерными клетками и/или МНКПК (например, экспрессирующими F158/V158 или V158/V158 Fc $\gamma$ R1IA) против антиген-экспрессирующих клеток-мишеней, по сравнению с антителом, содержащим референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования (например, антитело, содержащее Fc IgG1 человека, содержащий мутации G236A, A330L и I332E);

(ii) увеличение АЗКФ моноцитами (например, CD14+ моноцитами, необязательно экспрессирующими F158/V158 Fc $\gamma$ R1IA и R131/H131 Fc $\gamma$ R1IA или F158/F158 Fc $\gamma$ R1IA и R131/H131 Fc $\gamma$ R1IA) против антиген-экспрессирующих клеток-мишеней, по сравнению с антителом, содержащим референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования;

(iii) увеличение процента клеток CD83+ (например, моДК) и/или увеличение экспрессии CD83 из моДК в образце при введении в комбинации с антигеном, по сравнению с антителом, содержащим референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования, при введении в комбинации с антигеном;

(iv) увеличение продуцирования одного или нескольких цитокинов (необязательно выбранных из группы, состоящей из IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, и TNF- $\alpha$ ) из моДК в образце при введении в комбинации с антигеном, по сравнению с антителом, содержащим референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования, при введении в комбинации с антигеном; и

(v) увеличение способности моДК стимулировать антиген-специфические CD4+ T-клетки при введении к моДК в комбинации с антигеном, по сравнению с антителом, содержащим референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования, при введении к моДК в комбинации с антигеном, причем,

необязательно, (1) моДК и CD4+ Т-клетки получены от одного и того же (необязательно вакцинированного антигеном) субъекта и/или (2) стимуляцию антигенспецифических CD4+ Т-клеток определяют по повышению экспрессии CD25 и/или повышению пролиферации (например, при определении по снижению окрашивания CFSE со временем) и/или повышению экспрессии CD69 и/или повышению экспрессии NFAT и/или повышению экспрессии CD44, антигенспецифическими CD4+ Т-клетками.

Вариант осуществления 62. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 1-61, причем указанный вариант дополнительно содержит одну или несколько модификаций, которые усиливают или дополнительно усиливают связывание с FcRn человека

по сравнению с (1) референсным полипептидом, который содержит полипептид Fc IgG1 человека дикого типа и/или с (2) полипептидом по любому из Вариантов осуществления 1-61 без одной или нескольких модификаций.

Вариант осуществления 63. Полипептид по Варианту осуществления 62, причем указанные одна или несколько модификаций, которые усиливают связывание с FcRn человека, включают аминокислотные замены:

- (i) M428L/N434S;
- (ii) M252Y/S254T/T256E;
- (iii) T250Q/M428L;
- (iv) P257I/Q311I;
- (v) P257I/N434H;
- (vi) D376V/N434H;
- (vii) T307A/E380A/N434A;
- (viii) N434A;
- (ix) M428L/N434A; или
- (x) любую комбинацию (i)-(ix).

Вариант осуществления 64. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 1-63, причем указанный вариант не содержит каких-либо дополнительных мутаций по сравнению с референсным полипептидом Fc IgG или его фрагментом, полипептидом CH2 IgG, полипептидом шарнир-CH2 IgG, или полипептидом шарнир-Fc IgG или его фрагментом, соответственно.

Вариант осуществления 65. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 1-64, который содержит полипептид Fc.

Вариант осуществления 66. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 1-65, который представляет собой мономер, состоящий из димера полипептида (например, димера Fc).

Вариант осуществления 67. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 1-66, который представляет собой мономер, состоящий из гомодимера полипептида (например, гомодимера Fc).

Вариант осуществления 68. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 1-66, который представляет собой мономер, состоящий из гетеродимера полипептида (например, гетеродимера Fc, необязательно содержащего выступ в первом Fc гетеродимера и соответствующую полость во втором Fc гетеродимера, и/или содержащего одну или несколько мутаций, которые обеспечивают или создают противоположный заряд в каждом из двух мономеров Fc (например, положительный заряд в области первого мономера и отрицательный заряд в соответствующей области второго мономера), и/или содержащего гетерологичную аминокислотную последовательность в одном или обоих мономерах, для стимулирования димеризации двух мономеров Fc).

Вариант осуществления 69. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 1-68, который входит в состав антитела.

Вариант осуществления 70. Антитело, содержащее полипептид по любому из Вариантов осуществления 1-69.

Вариант осуществления 71. Антитело, содержащее вариант Fc IgG, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU и лейцин (L) в положении 300 по EU.

Вариант осуществления 72. Антитело, содержащее вариант Fc IgG, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, валин (V) в положении 328 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 295 по EU.

Вариант осуществления 73. Антитело, содержащее вариант шарнира-Fc IgG, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, аланин (A) в положении 230 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 295 по EU.

Вариант осуществления 74. Антитело, содержащее вариант Fc IgG, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, пролин (P) в положении 292 по EU и аспарагин (N) в положении 377 по EU.

Вариант осуществления 75. Антитело, содержащее вариант Fc IgG, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, аланин (A) в положении 334 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 295 по EU.

Вариант осуществления 76. Антитело, содержащее вариант Fc IgG, причем указанный вариант содержит серин (S) в положении 236 по EU, пролин (P) в положении 292 по EU и лейцин (L) в положении 300 по EU.

Вариант осуществления 77. Антитело, содержащее вариант Fc IgG, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, пролин (P) в положении 292 по EU и лейцин (L) в положении 300 по EU.

Вариант осуществления 78. Антитело, содержащее вариант Fc IgG, причем указанный вариант содержит серин (S) в положении 236 по EU, валин (V) в положении 420 по EU, глутаминовую кислоту (E) в положении 446 по EU и треонин (T) в положении 309 по EU.

Вариант осуществления 79. Антитело, содержащее вариант Fc IgG, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU и лейцин (L) в положении 300 по EU.

Вариант осуществления 80. Антитело, содержащее вариант Fc IgG, причем указанный вариант содержит пролин (P) в положении 292 по EU и лейцин (L) в положении 300 по EU.

Вариант осуществления 81. Антитело, содержащее вариант Fc IgG, причем указанный вариант содержит лейцин (L) в положении 300 по EU.

Вариант осуществления 82. Антитело, содержащее вариант Fc IgG, причем указанный вариант содержит лизин (K) в положении 345 по EU, серин (S) в положении 236 по EU, тирозин (Y) в положении 235 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 267 по EU.

Вариант осуществления 83. Антитело, содержащее вариант шарнира-Fc IgG, причем указанный вариант содержит аргинин (R) в положении 272 по EU, треонин (T) в положении 309 по EU, тирозин (Y) в положении 219 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 267 по EU.

Вариант осуществления 84. Антитело, содержащее вариант Fc IgG, причем указанный вариант содержит тирозин (Y) или триптофан (W) в положении 236 по EU.

Вариант осуществления 85. Антитело, содержащее вариант Fc IgG, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, при этом полипептид Fc IgG или его фрагмент и, необязательно, антитело, является афукозилированным, и при этом, дополнительно необязательно, вариант содержит лейцин (L) в положении 330 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 332 по EU, при этом, еще дополнительно необязательно, вариант не содержит аспарагиновую кислоту (D) в положении 239 по EU и, еще дополнительно необязательно, содержит серин (S) в положении 239 по EU.

Вариант осуществления 86. Антитело, содержащее вариант Fc IgG, причем указанный вариант содержит:

(1) лейцин (L) в положении 243 по EU, глутаминовую кислоту (E) в положении 446 по EU, лейцин (L) в положении 396 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 267 по EU; или

(2) аланин (A) в положении 236 по EU, аспарагиновую кислоту (D) в положении 239 по EU, глутаминовую кислоту (E) в положении 332 по EU, лейцин (L) в положении 428 по EU и серин (S) или аланин (A) в положении 434 по EU.

Вариант осуществления 87. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 1-69 или антитело по любому из Вариантов осуществления 70-86, причем вариант получен из, или содержит, изотип IgG1, изотип IgG2, изотип IgG3 или изотип IgG4.

Вариант осуществления 88. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 1-68 и 87, или антитело по любому из Вариантов осуществления 70-87, причем вариант получен из, или содержит, Fc человека или его фрагмент, или из тяжелой цепи антитела человека или ее фрагмента.

Вариант осуществления 89. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 1-69, 87, и 88, или антитело по любому из Вариантов осуществления 70-88, причем вариант получен из, или содержит, изотип IgG1 человека, изотип IgG2 человека, изотип IgG3 человека или изотип IgG4 человека.

Вариант осуществления 90. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 1-69 и 87-89, или антитело по любому из Вариантов осуществления 70-89, причем вариант получен из, или содержит, изотип IgG1 человека, необязательно содержащий аллотип G1m3, аллотип G1m17, аллотип G1m3,1 или аллотип G1m17,1.

Вариант осуществления 91. Антитело по любому из Вариантов осуществления 70-90, которое:

(i) способно связываться с FcγRIIIa человека, причем FcγRIIIa человека содержит V158, F158, или оба;

(ii) способно связываться с FcγRIIIb человека;

(iii) способно связываться с FcRn человека, необязательно при pH 6;

(iv) способно связываться с компонентом 1q (C1q) комплемента человека, необязательно со связыванием, которое повышено более чем 1-кратно, по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 3-кратно, или по меньшей мере 4-кратно по сравнению со связыванием антитела, содержащего референсный полипептид Fc;

(v) имеет более высокую T<sub>m</sub>, и/или может продуцироваться с более высоким титром, и/или способно связываться с FcγRIIIa человека (необязательно, H131 и/или R131) с более высокой аффинностью и/или авидностью, и/или способно связываться с FcγRIIIb человека с более низкой аффинностью и/или авидностью,

по сравнению с

- (1) референсным антителом, которое содержит Fc IgG1 человека, содержащий аминокислотные замены G236A, S239D, A330L и I330E (нумерация EU), причем референсное антитело необязательно не содержит каких-либо других аминокислотных замен в Fc по сравнению с Fc IgG1 человека дикого типа,
- (2) референсным антителом, которое содержит Fc IgG1 человека, содержащий аминокислотные замены G236A, A330L и I330E (нумерация EU), причем референсное антитело необязательно (a) дополнительно содержит мутации M428L и N434S или мутации M428L и N434A и/или (b) не содержит каких-либо других аминокислотных замен в Fc по сравнению с Fc IgG1 человека дикого типа и/или (c) не содержит мутацию S239D,
- (3) референсным антителом, содержащим Fc IgG1 человека, который содержит аминокислотную замену G236A или G236S (нумерация EU) и, необязательно, не содержит каких-либо других аминокислотных замен в Fc по сравнению с Fc IgG1 человека дикого типа,
- (4) референсным антителом, которое содержит Fc IgG1 человека, содержащий аминокислотные замены A330L и I332E (нумерация EU), причем референсное антитело необязательно не содержит

каких-либо других аминокислотных замен в Fc по сравнению с Fc IgG1 человека дикого типа; и/или

- (5) референсным антителом, содержащим Fc IgG1 человека дикого типа;
- (vi) способно стимулировать сигнализацию через FcγRa в клетке-хозяине, причем, необязательно, (a) сигнализация повышена по сравнению с сигнализацией, стимулируемой референсным антителом и/или (b) при этом FcγRa включает H131 FcγRIIa, R131 FcγRIIa, V158 FcγRIIa, F158 FcγRIIa, или любую их комбинацию;
- (vii) способно стимулировать антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦТ);
- (viii) способно стимулировать антитело-зависимый фагоцитоз (АЗКФ);
- (ix) способно стимулировать комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ);
- (x) способно образовывать иммунный комплекс; или
- (xi) любую комбинацию (i)-(x).

Вариант осуществления 92. Антитело по любому из Вариантов осуществления 70-91, причем антитело способно на любое одно или несколько из следующего:

- (i) увеличение специфического лизиса (например, посредством АЗКЦТ) естественными киллерными клетками и/или МНКПК (например, экспрессирующими F158/V158 или V158/V158 FcγRIIa) против антиген-экспрессирующих клеток-мишеней, по сравнению с антителом, содержащим референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования (например, антитело, содержащее Fc IgG1 человека, содержащий мутации G236A, A330L и I332E);
- (ii) увеличение АЗКФ моноцитами (например, CD14+ моноцитами, необязательно экспрессирующими F158/V158 FcγRIIa и R131/H131 FcγRIIa или F158/F158 FcγRIIa и R131/H131 FcγRIIa) против антиген-экспрессирующих клеток-мишеней, по сравнению с антителом, содержащим референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования;
- (iii) увеличение процента клеток CD83+ (например, моДК) и/или увеличение экспрессии CD83 из моДК в образце при введении в комбинации с антигеном, по сравнению с антителом, содержащим референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования, при введении в комбинации с антигеном;
- (iv) увеличение продуцирования одного или нескольких цитокинов (необязательно выбранных из группы, состоящей из IL-1β, IFN-γ, IL-6, и TNF-α) из моДК в образце при

введении в комбинации с антигеном, по сравнению с антителом, содержащим референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования, при введении в комбинации с антигеном; и

(v) увеличение способности моДК стимулировать антиген-специфические CD4+ Т-клетки при введении к моДК в комбинации с антигеном, по сравнению с антителом, содержащим референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования, при введении к моДК в комбинации с антигеном, причем, необязательно, (1) моДК и CD4+ Т-клетки получены от одного и того же (необязательно вакцинированного антигеном) субъекта и/или (2) стимуляцию антигенспецифических CD4+ Т-клеток определяют по повышению экспрессии CD25 и/или повышению пролиферации (например, при определении по снижению окрашивания CFSE со временем) и/или повышению экспрессии CD69 и/или повышению экспрессии NFAT и/или повышению экспрессии CD44, антигенспецифическими CD4+ Т-клетками.

Вариант осуществления 93. Антитело по любому из Вариантов осуществления 70-92, причем вариант дополнительно содержит одну или несколько модификаций, которые усиливают связывание с FcRn человека

по сравнению с (1) референсным антителом, содержащим полипептид Fc IgG1 человека дикого типа и/или с (2) антителом по любому из Вариантов осуществления 70-92 без одной или нескольких модификаций.

Вариант осуществления 94. Антитело по Варианту осуществления 93, причем указанные одна или несколько модификаций, которые усиливают связывание с FcRn человека, включают аминокислотные замены:

- (i) M428L/N434S;
- (ii) M252Y/S254T/T256E;
- (iii) T250Q/M428L;
- (iv) P257I/Q311I;
- (v) P257I/N434H;
- (vi) D376V/N434H;
- (vii) T307A/E380A/N434A;
- (viii) M428L/N434A; или
- (ix) любую комбинацию (i)-(viii).

Вариант осуществления 95. Антитело по любому из Вариантов осуществления 70-94, причем вариант не содержит каких-либо дополнительных мутаций по сравнению с референсным Fc IgG дикого типа.

Вариант осуществления 96. Полипептид по Варианту осуществления 69, или антитело по любому из Вариантов осуществления 70-95, причем указанное антитело способно специфически связываться с:

(i) мишенью (например, антигеном), которая экспрессируется или продуцируется патогеном (например, вирусом, бактерией, паразитом, грибом) или клеткой, инфицированной патогеном, причем, необязательно, патоген включает вирус и указанный вирус включает: коронавирус; бетакоронавирус; сарбековир; эмбековир; нобековир; мербековир; метапневмовирус; гибековир; SARS-CoV-2; вирус гепатита В; вирус гепатита D; вирус гриппа А; цитомегаловирус; риновирус; вирус гепатита С; вирус гриппа В; вирус иммунодефицита человека; респираторный вирус; респираторно-синцитиальный вирус; вирус Зика; вирус бешенства; вирус денге; флавивирус; эболавир; или любую их комбинацию;

(ii) мишенью (например, антигеном), которая экспрессируется, и/или экспрессирована на клеточной поверхности опухолевой клетки, необязательно, раковой клетки или клетки пролиферативного или гиперпролиферативного расстройства;

(iii) мишенью (например, антигеном), которая ассоциирована с аутоиммунным заболеванием;

(iv) мишенью (например, антигеном), которая ассоциирована с нейродегенеративным заболеванием;

(v) сигнальной молекулой иммунной системы, такой как цитокин;

(vi) мишенью (например, антигеном), которая ассоциирована с воспалением;

(vii) мишенью (например, антигеном), которая ассоциирована с неинфекционным заболеванием; или

(viii) любой комбинацией (i)-(vii).

97. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 69, 87-90 и 96, или антитело по любому из Вариантов осуществления 70-96, которое содержит химерное антитело, гуманизированное антитело, нейтрализующее антитело, антитело человека, IgNAR, нанотело, полученное от верблюдовых, или любую их комбинацию.

Вариант осуществления 98. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 69, 87-90, 96 и 97, или антитело по любому из Вариантов осуществления 70-96, причем

указанное антитело представляет собой мультиспецифическое антитело, такое как биспецифическое антитело, триспецифическое антитело или тетраспецифическое антитело.

Вариант осуществления 99. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 69, 87-90 и 96-98, или антитело по любому из Вариантов осуществления 70-98, причем антитело входит в состав конъюгата антитела.

Вариант осуществления 100. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 1-69, 87-90 и 96-99, или антитело по любому из Вариантов осуществления 70-99, причем полипептид или полипептид Fc: (1) содержит слитый белок Fc; и/или (2) содержит Fcab.

Вариант осуществления 101. Полипептид или антитело по Варианту осуществления 100, причем слитый белок Fc дополнительно включает:

- (i) рецепторный домен (например, эктодомен рецепторного белка, или его лигандсвязывающий участок);
- (ii) лиганд;
- (iii) замещающий белок; или
- (iv) любую комбинацию (i)-(iii).

Вариант осуществления 102. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 1-69, 87-90 и 96-101, или антитело по любому из Вариантов осуществления 70-101, которые конъюгированы, связаны или слиты с фрагментом полезной нагрузки.

Вариант осуществления 103. Полипептид или антитело по Варианту осуществления 102, причем фрагмент полезной нагрузки включает: антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; цитотоксический агент (например, химиотерапевтический агент); детектируемое соединение или детектируемую метку; олигонуклеотид (например, антисмысловый олигонуклеотид, миРНК и т.п.); вектор; агент, который стимулирует иммунный ответ; фактор роста; или любую их комбинацию.

Вариант осуществления 104. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 1-69, 87-90 и 96-103, или антитело по любому из Вариантов осуществления 70-103, которые: являются афукозилированными; были продуцированы в клетке-хозяине, неспособной к фукозилированию или с ингибированной способностью фукозилировать полипептид; были продуцированы в условиях, которые ингибируют их фукозилирование клеткой-хозяином; или любая их комбинация.

Вариант осуществления 105. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 1-69, 87-90 и 96-104, или антитело по любому из Вариантов осуществления 70-104,

содержащие аминокислотную мутацию, которая (1) ингибирует фукозилирование по сравнению с референсным полипептидом или антителом, соответственно, и/или (2) которая подавляет сайт фукозилирования, присутствующий в референсном полипептиде или антителе, соответственно.

Вариант осуществления 106. Полинуклеотид, кодирующий полипептид по любому из Вариантов осуществления 1-69, 87-90 и 96-105, или антитело по любому из Вариантов осуществления 70-105.

Вариант осуществления 107. Полинуклеотид по Варианту осуществления 106, причем указанный полинуклеотид оптимизирован по кодонам для экспрессии клеткой-хозяином.

Вариант осуществления 108. Какой-либо (например, экспрессионный) вектор, содержащий полинуклеотид по Варианту осуществления 106 или 107.

Вариант осуществления 109. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по Варианту осуществления 106 или 107.

Вариант осуществления 110. Клетка-хозяин, содержащая вектор по Варианту осуществления 108.

Вариант осуществления 111. Клетка-хозяин, экспрессирующая: полипептид по любому из Вариантов осуществления 1-69, 87-90 и 96-105; и/или антитело по любому из Вариантов осуществления 70-105.

Вариант осуществления 112. Композиция, содержащая:

- (i) полипептид по любому из Вариантов осуществления 1-69, 87-90 и 96-105; и/или
- (ii) антитело по любому из Вариантов осуществления 70-105; и/или
- (iii) полинуклеотид по Варианту осуществления 106 или 107; и/или
- (iv) вектор по Варианту осуществления 108; и/или
- (v) клетку-хозяина по любому из Вариантов осуществления 109-111,

и фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель.

Вариант осуществления 113. Способ лечения или предотвращения заболевания или расстройства у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества:

- (i) полипептида по любому из Вариантов осуществления 1-69, 87-90 и 96-105;
- (ii) антитела по любому из Вариантов осуществления 70-105;
- (iii) полинуклеотида по Варианту осуществления 106 или 107;
- (iv) вектора по Варианту осуществления 108;

(v) клетки-хозяина по любому из Вариантов осуществления 109-111; и/или

(vi) композиции по Варианту осуществления 112.

Вариант осуществления 114. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 1-69, 87-90 и 96-105, антитело по любому из Вариантов осуществления 70-105, полинуклеотид по Варианту осуществления 106 или 107, вектор по Варианту осуществления 108, клетка-хозяин по любому из Вариантов осуществления 109-111 и/или композиция по Варианту осуществления 112, для использования в лечении или предотвращении заболевания или расстройства у субъекта.

Вариант осуществления 115. Полипептид по любому из Вариантов осуществления 1-69, 87-90 и 96-105, антитело по любому из Вариантов осуществления 70-105, полинуклеотид по Варианту осуществления 106 или 107, вектор по Варианту осуществления 108, клетка-хозяин по любому из Вариантов осуществления 109-111 и/или композиция по Варианту осуществления 112, для использования в производстве медикамента для лечения или предотвращения заболевания или расстройства у субъекта.

Вариант осуществления 116. Способ по Варианту осуществления 113 или полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетка-хозяин и/или композиция для применения Варианта осуществления 114 или 115, причем указанное заболевание включает инфекционное заболевание (необязательно вызываемое вирусной, бактериальной, грибковой или паразитарной инфекцией), раковое заболевание, пролиферативное расстройство, нейродегенеративное заболевание, аутоиммунное заболевание или любую их комбинацию.

Вариант осуществления 117. Способ по Варианту осуществления 116 или полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетка-хозяин и/или композиция для применения Варианта осуществления 116, причем инфекционное заболевание включает: коронавирусную инфекцию, бетакоронавирусную инфекцию, сарбековирную инфекцию, эмбековирную инфекцию, нобековирную инфекцию, мербековирную инфекцию, метапневмовирную инфекцию, гиббековирную инфекцию, инфекцию SARS-CoV-2, инфекцию вируса гепатита В, инфекцию вируса гепатита D, инфекцию вируса гепатита С, цитомегаловирную инфекцию, инфекцию вируса гриппа А, инфекцию вируса гриппа В, инфекцию вируса иммунодефицита человека, респираторную вирусную инфекцию, респираторно-синцитиальную вирусную инфекцию, инфекцию вируса Зика, инфекцию вируса бешенства, инфекцию вируса денге, флавивирную инфекцию, эболавирную инфекцию или любую их комбинацию.

Таблица 2. Таблица последовательностей

Описание	SEQ ID NO.	Последовательность
CH1-CH3 IgG1 человека дикого типа (UniProtKB P01857); <u>шарнир выделен подчеркиванием</u> , CH2 выделен курсивом	1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK <u>VEPKSCDKTHTCPP</u> <u>CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV</u> <i>SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV</i> <i>VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA</i> KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Шарнир-CH2-CH3 IgG1 человека дикого типа; <u>шарнир выделен подчеркиванием</u> , CH2 выделен курсивом	2	<u>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR</u> <i>TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE</i> <i>EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE</i> <i>KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG</i> FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
CH2 IgG1 человека дикого типа	3	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
CH3 IgG1 человека дикого типа	4	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Шарнир-CH2 IgG1 человека дикого	5	<u>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR</u> <i>TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE</i>

Описание	SEQ ID NO.	Последовательность
<p>типа; <u>шарнир</u> <u>выделен</u> <u>подчеркиванием</u>, <i>CH2 выделен</i> <i>курсивом</i></p>		<p><i>EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAK</i></p>
<p>Аминокислотная последовательность CH2-CH3 IgG1 человека с мутациями G236A, L328V и Q295E</p>	6	<p>APELLAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAVPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>Аминокислотная последовательность шарнир-CH2-CH3 IgG1 человека с мутациями G236A, P230A и Q295E</p>	7	<p>EPKSCDKTHTCPPCAPELLAGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK</p>
<p>Аминокислотная последовательность CH2-CH3 IgG1 человека с мутациями G236A, R292P и I377N</p>	8	<p>APELLAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDNA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>Аминокислотная последовательность CH2-CH3 IgG1 человека с</p>	9	<p>APELLAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEATISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV</p>

Описание	SEQ ID NO.	Последовательность
мутациями G236A, K334A и Q295E		EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Аминокислотная последовательность CH2-CH3 IgG1 человека с мутациями G236S, R292P и Y300L	10	APELLSGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTLRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Аминокислотная последовательность CH2-CH3 IgG1 человека с мутациями G236A и Y300L	11	APELLAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTLRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Аминокислотная последовательность CH2-CH3 IgG1 человека с мутациями G236A, R292P и Y300L	12	APELLAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTLRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Аминокислотная последовательность CH2-CH3 IgG1 человека с мутациями G236S, G420V, G446E и	13	APELLSGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVTHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQVNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPEK

Описание	SEQ ID NO.	Последовательность
L309T		
Аминокислотная последовательность CH2-CH3 IgG1 человека с мутациями G236A и R292P	14	<p>APELLAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH  EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVS  VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG  QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR  WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
Аминокислотная последовательность CH2-CH3 IgG1 человека с мутациями R292P и Y300L	15	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH  EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTLRVVS  VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG  QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR  WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
Аминокислотная последовательность CH2-CH3 IgG1 человека с мутациями G236A и R292P	16	<p>APELLAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH  EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTYRVVS  VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG  QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR  WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
Аминокислотная последовательность CH2-CH3 IgG1 человека с мутацией Y300L	17	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH  EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTLRVVS  VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG  QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR  WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
Аминокислотная	18	<p>APELYSGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEH</p>

Описание	SEQ ID NO.	Последовательность
последовательность CH2-CH3 IgG1 человека с мутациями E345K, G236S, L235Y и S267E		EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRKPKQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Аминокислотная последовательность шарнир-CH2-CH3 IgG1 человека с мутациями E272R, L309T, S219Y и S267E	19	EPKYCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPRVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVTHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Аминокислотная последовательность CH2-CH3 IgG1 человека с мутацией G236Y	20	APELLYGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Аминокислотная последовательность CH2-CH3 IgG1 человека с мутацией G236W	21	APELLWGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Аминокислотная последовательность CH2-CH3 IgG1	22	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG

Описание	SEQ ID NO.	Последовательность
человека с мутациями F243L, G446E, P396L и S267E		QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPLVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPEK
Аминокислотная последовательность CH2-CH3 IgG1 человека с мутацией G236A	23	APELLAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPLVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
[зарезервировано]	24	
[зарезервировано]	25	
Аминокислотная последовательность VH HBC34-v35	26	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSFYMSWV RQAPGKGLEWVATINQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDN AKNSLFLQMNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGMDV WGQGTTVSVSS
Аминокислотная последовательность VL HBC34-v35	27	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGKNVAVWFQH KPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISG TQAMDEAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL
Аминокислотная последовательность VH S309	28	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYPFTSYGISWV RQAPGQGLEWMGWISTYNGNTNYAQKFQGRVTMTT DTSTTTGYMELRRLRSDDTAVYYCARDYTRGAWFGE SLIGGFNDNWGQGTLVTVSS
Аминокислотная последовательность VL S309	29	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQTVSSTSLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQHDTSLTFGGGGTKVEIK
Аминокислотная последовательность VH S2X259	30	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGIFNTYTISWV RQAPGQGLEWMGRILMSGMANYAQKIQGRVTITAD KSTSTAYMELTSLRSDDTAVYYCARGFNGNYYGWGD DDAFDISGQGTLVTVYS

Описание	SEQ ID NO.	Последовательность
Аминокислотная последовательность VL S2X259	31	QTVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSNSNIGAGYDVHW YQQLPGTAPKLLICGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASL AITGLQAEDEADYYCQSYDSSLGPNWVFGGGTKLTV L
Аминокислотная последовательность VH S2X259-v5	32	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGIFNTYTISWV RQAPGQGLEWMGRIILMSGMANYAQKIQRVTITAD KSTSTAYMELTSLRSDDTAVYYCARGFNGNYYGWGD DDAFDIWGQGLVTVSS
Аминокислотная последовательность VL варианта S2X259	33	QTVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSNSNIGAGYDVHW YQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASL AITGLQAEDEADYYCQSYDSSLGPNWVFGGGTKLTV L
Аминокислотная последовательность VH FM08	34	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSYNAVWN WIRQSPSRGLEWLGRTYRSGWYNDYAESVKSRITIN PDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARSGHITVFGVN VDAFDMWGQGMVTVSS
Аминокислотная последовательность VL FM08	35	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQSLSSYTHWYQQ KPGKAPKLLIYAASSRGSVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQRFTFGQGTKVEIK
CH1-CH3 IgG1m3	36	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
CH1-CH3 IgG1m17,1	37	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT

Описание	SEQ ID NO.	Последовательность
		VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
CH1-CH3 IgG1m3,1	38	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Аминокислотная последовательность VH HBC34-v40	39	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSFYMSWV RQAPGKGLEWVATINQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDN AKNSLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGMDV WGQGTTVSVSS
Аминокислотная последовательность VL HBC34-v40	40	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGKNVAWFQH KPGQSPVLVIYQDSYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISG TQAMDEAAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL
Аминокислотная последовательность VH S2X259.1-v3.2	41	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGIDQTYTISWV RQAPGQGLEWMGRILISGRADYAQKIQGRVTITADKS TSTAYMELTSLRSDDTAVYYCARGFNANYYGWGDD DAFDIWGQGTLLTVSS
Аминокислотная последовательность	42	QTVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSNSNIGAGYDVHW YQQLPGTAPKLLIVGQSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASL

Описание	SEQ ID NO.	Последовательность
VL S2X259.1-v3.2		AITGLQAEDEADYYCQSYDSSGSAPNWVFGGGTKLT VL
Аминокислотная последовательность VH сотровимаба	43	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYPFTSYGISWV RQAPGQGLEWMGWISTYQGNTNYAQKFQGRVTMTT DTSTTTGYMELRRLRSDDTAVYYCARDYTRGAWFGE SLIGGFNWDWGQGLTVTVSS
Аминокислотная последовательность VL сотровимаба	44	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQTVSSTSLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTIS RLEPEDFAVYYCQQHDTSLTFGGGTKVEIK
Аминокислотная последовательность CH2-CH3 IgG1 человека с мутациями G236A, S239D и H268E	45	APELLAGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSE EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Аминокислотная последовательность VL S2X259-v5	46	QTVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSNSNIGAGYDVHW YQQLPGTAPKLLIVGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASL AITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGPNWVFGGGTKLTV L
Аминокислотная последовательность VH S2X259.1	47	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGIDNTYTISWV RQAPGQGLEWMGRILISGRADYAQKIQGRVTITADKS TSTAYMELTSLRSDDTAVYYCARGFNGNYYGWGDD DAFDIWGQGLTVTVSS
Аминокислотная последовательность VL S2X259.1	48	QTVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSNSNIGAGYDVHW YQQLPGTAPKLLIVGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASL AITGLQAEDEADYYCQSYDSSGSAPNWVFGGGTKLT VL

## ПРИМЕРЫ

### ПРИМЕР 1

#### ПОВЫШЕННОЕ СВЯЗЫВАНИЕ FcγRIIA УЛУЧШАЕТ ПРОФИЛАКТИКУ И ПОВЫШАЕТ ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНТИТЕЛ В МЫШИНОЙ МОДЕЛИ ИНФЕКЦИИ ГРИППА А

Моноклональные антитела против гриппа А, несущие домен Fc дикого типа или домен Fc, содержащий известную мутацию или мутации, тестировались в мышинной модели инфекции. Мышам, экспрессирующим FcγR человека, вводили внутривенно моноклональные антитела против гриппа А за два дня до интраназального инфицирования летальной дозой H1N1 PR8 (Фиг. 1А). Уровни IgG в сыворотке оценивали в момент заражения (день 0), а вес тела и выживаемость мышей определяли на протяжении четырнадцати дней.

Мыши, получавшие антитело «F18» против IgG1 FluA, несущее мутации Fc G236A/A330L/I332E/M428L/N434S, более эффективно сохраняли вес по сравнению с мышами, получавшими антитело F18, несущее в Fc только мутации M428L/N434S (Фиг. 1В). Мыши, получавшие антитело, несущее мутации Fc G236A («GA») или G236A/A330L/I332E («GAALIE»), сохраняли вес и имели улучшенную выживаемость по сравнению с мышами, получавшими антитело, несущее Fc дикого типа или Fc с другими модификациями (Фиг. 1С и 1D).

### ПРИМЕР 2

#### КОНСТРУИРОВАНИЕ НОВЫХ ВАРИАНТОВ Fc

Области Fc IgG1 человека были генетически модифицированы для улучшения функциональности, например, чтобы потенциально способствовать профилактическим, терапевтическим или вакцинальным эффектам путем активации определенных FcγR (например, FcγRIIA, FcγRIIA, FcγRIIB). Усиление активации FcγRIIA на ранних стадиях инфекции может способствовать антителозависимому клеточному фагоцитозу (АЗКФ) и

нейтрализации вируса. Усиление активации Fc $\gamma$ RIIA и/или Fc $\gamma$ RIIA при поздней или установленной инфекции может способствовать АЗКФ и/или антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦТ), облегчать клиренс вирусных инфицированных клеток и блокировать распространение вируса. Усиление активации Fc $\gamma$ RIIA и/или Fc $\gamma$ RIIA в любой момент времени при инфекции может обеспечивать вакцинальный эффект, способствуя презентации антигена и адаптивному иммунитету.

Варианты Fc были подвергнуты оценке, и новые варианты разрабатывались с использованием итеративного процесса их выявления. Был сгенерирован первоначальный набор из примерно 2500 точечных мутаций Fc, а также собраны и проанализированы функциональные данные. Функциональные данные включали взаимодействия связывания (например, с Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA (R131), Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIIC, Fc $\gamma$ RIIA (V158), FcRn и C1q), сигнализацию через Fc $\gamma$ R, термостабильность, экспрессируемость, полиреактивность и возможность увеличения периода полувыведения. Для помощи в разработке последующих вариантов был разработан алгоритм на основе машинного обучения и многофакторного прогнозирования. Варианты Fc экспрессировали в виде антител IgG1 против гриппа А (с Fab FY1; Kallewaard *et al. Cell* 166(3):596-608 (2016)) в клетках CHO, титровали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и очищали на колонках с протеином А. Первый планшет (2 x 96, с 2-дезоксидезокси-2-фтор-L-фукозой (2FF), которая ингибирует фукозилрование, или без нее) содержал лунки для измерения эффектов известных мутаций (в качестве эталона) и лунки для измерения эффектов новых мутаций (одиночных или комбинированных).

Варианты Fc анализировали с использованием различных анализов для оценки биофизических, биохимических и биологических свойств. К ним относятся агрегация (например, методом эксклюзионной хроматографии), термостабильность, гликозилрование, структура, сигнализация и связывание (например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса или анализов с помощью системы Meso Scale Discovery). Также тестировали эффекторные функции, включая антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦТ) и антитело-зависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ). Были оценены характеристики связывания для отдельных мутаций Fc, определены комбинации до трех мутаций, которые оказывали наибольший эффект на увеличение соотношения IIА/IIВ, и включены дополнительные варианты. Полученные дополнительные варианты были проанализированы. Интерес представляли такие характеристики, как повышенная аффинность к Fc $\gamma$ RIIA при пониженной аффинности к

FcγRIIb, или наоборот. С использованием несмещенного кластерного анализа и радиолокационного метода обработки данных с ручным анализом было выявлено девять кластеров вариантов Fc с сильно увеличенной, повышенной, схожей или одинаковой, сниженной или сильно сниженной аффинностью к различным FcγR и FcRn.

Аффинности связывания (измеряемые методом MSD), T<sub>m</sub> и титры продукции для некоторых вариантов Fc показаны на Фиг. 3. Из десяти вариантов, для которых изначально было предсказано увеличение соотношения связывания FcγRIIA/FcγRIIB, пять (со значениями IIA/IIIB, выделенными жирным шрифтом на Фиг. 3) увеличили это соотношение, по результатам измерения методом MSD.

### ПРИМЕР 3

#### ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ ВАРИАНТОВ Fc

На основе результатов, полученных на первом планшете вариантов, описанном в Примере 2, был сгенерирован второй планшет вариантов (2 x 20, с 2FF и без него). Двадцать антител с вариантами Fc были экспрессированы и очищены для оценки титра и выхода. Варианты экспрессировали с 2FF или без него, чтобы определить влияние фукозилирования на титр и выход (Фиг. 4А-4С). Фиг. 4А показывает титры антител, определенные с использованием колонки с белком А. Средний титр был выше для вариантов, экспрессирующихся в клетках без 2FF. На Фиг. 4В показаны выходы, полученные в двух репликах очистки (входной объем 900 мкл), с двумя элюциями на каждую очистку. На Фиг. 4С представлены теоретический максимальный выход, средний выход, среднее извлечение и концентрация белка для второго элюирования (измеряемая в мкг/мл). Варианты Fc были очищены с использованием двух элюций и объединены перед определением выхода. Средний выход был выше у очищенных вариантов Fc, экспрессированных без 2FF.

Очищенные антитела (+2FF и без 2FF) анализировали на способность к димеризации с помощью эксклюзионной хроматографии (Фиг. 5) и оценивали их T<sub>m</sub> (Фиг. 6А-6В). Низкомолекулярные формы наблюдались для вариантов C220P и R292P\_Y300L (только в +2FF-образцах). Значения T<sub>m</sub> для некоторых вариантов Fc отличались от ДТ не более чем на 4,2 °С; в качестве сравнения, T<sub>m</sub> варианта Fc GAALIE была приблизительно на 14 °С ниже значения для ДТ (тестировались на двух планшетах). Разворачивание СН<sub>2</sub>, проявляющееся в отсутствии второго пика на нижнем графике для

образца R292P на Фиг. 6B, не было обнаружено для вариантов, включающих R292P, за исключением комбинированного мутанта G236A\_R292P\_I377N.

Тестировали связывание вариантов Fc (без 2FF) с FcγRIIA-H (высокоаффинный), FcγRIIA-R (низкоаффинный), FcγRIIB, FcγRIIA-V (высокоаффинный), FcγRIIA-F (низкоаффинный) и FcRn (при pH 6) и выражали как кратность изменения по сравнению с Fc дикого типа (Фиг. 7A). Соотношение связывания FcγRIIA-H/FcγRIIB, а также связывание C1q и данные комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ) также представлены на Фиг. 7B. Варианты, представленные на Фиг. 8, не были обработаны 2FF. Сигнализацию антитела через разные FcγR измеряли с использованием репортерного анализа (люциферазные репортерные клетки Promega<sup>TM</sup>; среднее для 3 экспериментов). Фукозилированные варианты Fc тестировали на сигнализацию через все четыре представленные рецепторы FcγR (Фиг. 9A), в то время как афукозилированные варианты тестировали на сигнализацию через FcγRIIA-V и FcγRIIA-F (Фиг. 9B). Ряд вариантов Fc был отобран для дополнительной характеристики.

Краткое описание характеристик этих вариантов (как фукозилированных, так и афукозилированных), а также сравнительных вариантов Fc, содержащих известные мутации (например, G236A\_S239D\_A330L\_I332E ("GASDALIE"); G236A\_A330L\_I332E ("GAALIE")), представлено на Фиг. 10A-10C.

Несколько вариантов продемонстрировали улучшенные характеристики по сравнению с вариантом GAALIE, включая увеличение соотношения IIА/IIВ, повышение стабильности (Tm), сбалансированное связывание с аллелями FcγR, а также увеличение связывания C1q и активации комплемента. Дозозависимая сигнализация FcγR через FcγRIIA-H (высокоаффинный, Фиг. 12A) и FcγRIIB (Фиг. 12B) для одного из таких вариантов - «G236A\_R292P\_Y300L» - была измерена методом анализа с репортерными клетками.

Графики зависимости связывания FcγR вариантами Fc от сигнализации через FcγRIIA-H (высокоаффинный, Фиг. 13A) и FcγRIIB (Фиг. 13B) приведены на Фиг. 13A и 13B. Связывание FcγR измеряли с помощью системы анализа связывания Meso Scale Discovery и сигнализацию FcγR измеряли с использованием репортерного клеточного анализа.

Были проведены дополнительные эксперименты с использованием двух противогриппозных антител ГА (гемагглютинина) (FY1 и FM08) и анти-НВsAg антитела (НВС34-v35), результаты которых показаны/обобщены на Фиг. 15-17D. Эти результаты

показали, в частности, что антитела с афукозилированным вариантом Fc, несущие мутацию G236A ("GA"), сильнее связываются с FcγR IIА и IIIА по сравнению с антителами с фукозилированным вариантом Fc, несущими G236A\_A330L\_I332E ("GAALIE"), и вызывают сравнимую сигнализацию через FcγRIIIА, и потенциально более сильную сигнализацию через FcγRIIА, по сравнению с антителами с фукозилированным вариантом Fc, несущими GAALIE. Дополнительно, GA-афукозилированные антитела с вариантами Fc имели улучшенную температуру плавления по сравнению с фукозилированными несущими GAALIE антителами с вариантами Fc. GA-афукозилированные антитела с вариантами Fc индуцировали опосредованную ЕК-клетками АЗКЦТ против клеток-мишеней. GA-афукозилированные антитела с вариантами Fc сохраняли частичное связывание С1q (0,3х по сравнению с референсным антителом IgG1, несущим только мутации M428L и N434S), в то время как мутации GAALIE вызывали прекращение связывания С1q.

Кроме того, были проведены исследования, представленные и описанные на Фиг. 21-29Q. Фиг. 21-24 показывают активацию и связывание FcγR противогриппозным (ГА) антителом с вариантами Fc «FY1». Фиг. 25А-28D показывают активацию FcγR и специфический лизис для анти-SARS-CoV-2 антител (S309 и S2X259, и их варианты V-области) с вариантом Fc. Фиг. 29А-29R относятся к анти-HBsAg (HBC34-v40) антителам с вариантами Fc и показывают: активацию и продуцирование цитокинов дендритными клетками человека из моноцитов (моДК) с использованием антител и HBsAg; активацию HBsAg-специфических CD4+ Т-клеток памяти человека; активацию HBsAg-специфических TCR-трансгенных репортерных CD4+ Т-клеток Jurkat; повторную стимуляцию CD4+ Т-клеток памяти от HBV-вакцинированных huFcγR мышей иммунными комплексами (IC) антитело:HBsAg; и кинетику связывания (включая кратность изменения по сравнению с контрольным Fc) вариантов Fc HBC34-v40 с FcγR человека.

Различные варианты осуществления, описанные выше, могут быть объединены для обеспечения дополнительных вариантов осуществления. Все патенты США, публикации патентных заявок США, патентные заявки США, иностранные патенты, иностранные патентные заявки и непатентные публикации, упоминаемые в данном описании изобретения, включая предварительную заявку США № 63/192549, поданную 24 мая 2021 г., предварительную заявку США № 63/265032, поданную 6 декабря 2021 г., и

предварительную заявку США № 63/266453, поданную 5 января 2022 г., включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Аспекты вариантов осуществления могут быть модифицированы при необходимости использования концепций различных патентов, заявок и публикаций для создания дополнительных вариантов осуществления.

Эти и другие изменения могут быть внесены в варианты осуществления в свете приведенного выше описания. В общем, в приведенной далее формуле изобретения, использованные термины не должны истолковываться как ограничивающие формулу изобретения конкретными вариантами осуществления, раскрытыми в описании изобретения и формуле изобретения, но должны рассматриваться как включающие все возможные варианты осуществления, а также полный объем эквивалентов, на которые распространяется такая формула. Соответственно, формула изобретения не ограничена раскрытием.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмент,

причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU и лейцин (L) в положении 300 по EU.

2. Полипептид по п. 1, отличающийся тем, что вариант и, необязательно, полипептид, имеет повышенное связывание с FcγRIIIa человека

по сравнению со связыванием референсного полипептида с FcγRIIIa человека, при этом, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

3. Полипептид по п. 2, отличающийся тем, что повышенное связывание с FcγRIIIa человека включает по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, по меньшей мере 10-кратно, по меньшей мере 11-кратно, по меньшей мере 12-кратно, по меньшей мере 13-кратно, по меньшей мере 14-кратно, по меньшей мере 15-кратно, по меньшей мере 16-кратно, по меньшей мере 17-кратно, или по меньшей мере 18-кратно увеличенное связывание с FcγRIIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с FcγRIIIa человека.

4. Полипептид по п. 2 или 3, отличающийся тем, что FcγRIIIa человека содержит H131 и, необязательно, повышенное связывание с H131 FcγRIIIa человека включает по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, или по меньшей мере 10-кратно, по меньшей мере 11-кратно, по меньшей мере 12-кратно, по меньшей мере 13-кратно, по меньшей мере 14-кратно, по меньшей мере 15-кратно, по меньшей мере 16-кратно, по меньшей мере 17-кратно, или по меньшей мере 18-кратно увеличенное связывание с H131 FcγRIIIa человека по сравнению со связыванием

референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с H131 FcγRIIIa человека.

5. Полипептид по любому из пп. 2-4, отличающийся тем, что FcγRIIIa человека содержит R131 и, необязательно, повышенное связывание с R131 FcγRIIIa человека включает по меньшей мере 4-кратно увеличенное связывание с R131 FcγRIIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с R131 FcγRIIIa человека.

6. Полипептид по любому из пп. 2-5, отличающийся тем, что

(1) отношение (i) связывания варианта или полипептида с FcγRIIIa человека к (ii) связыванию варианта или полипептида, соответственно, с FcγRIIIb человека, является большим, чем

(2) отношение (iii) связывания референсного полипептида с FcγRIIIa человека к (iv) связыванию референсного полипептида с FcγRIIIb человека, причем референсный полипептид содержит полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент.

7. Полипептид по п. 6, отличающийся тем, что FcγRIIIa человека содержит H131.

8. Полипептид по п. 6 или 7, отличающийся тем, что FcγRIIIa человека содержит R131.

9. Полипептид по любому из пп. 6-8, отличающийся тем, что отношение (1) является по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, по меньшей мере 10-кратно, по меньшей мере 11-кратно, по меньшей мере 12-кратно, по меньшей мере 13-кратно, по меньшей мере 14-кратно, по меньшей мере 15-кратно, по меньшей мере 16-кратно, или по меньшей мере 17-кратно большим, чем отношение (2).

10. Полипептид по любому из пп. 1-9, дополнительно содержащий пролин (P) в положении 292 по EU.

11. Полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида CH<sub>2</sub> IgG или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмент,  
причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, валин (V) в положении 328 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 295 по EU.

12. Полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида шарнир-CH<sub>2</sub> IgG; или (ii) полипептида шарнир-Fc IgG или его фрагмент,  
причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, аланин (A) в положении 230 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 295 по EU.

13. Полипептид, содержащий вариант: полипептида Fc IgG или его фрагмент,  
причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, пролин (P) в положении 292 по EU и аспарагин (N) в положении 377 по EU.

14. Полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида CH<sub>2</sub> IgG или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмент,  
причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, аланин (A) в положении 334 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 295 по EU.

15. Полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида CH<sub>2</sub> IgG или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмент,  
причем указанный вариант содержит серин (S) в положении 236 по EU, пролин (P) в положении 292 по EU и лейцин (L) в положении 300 по EU.

16. Полипептид по любому из пп. 11-15, отличающийся тем, что вариант и, необязательно, полипептид, имеет повышенное связывание с FcγRIIIa человека и/или имеет пониженное связывание с FcγRIIIb человека,  
по сравнению со связыванием референсного полипептида с FcγRIIIa человека или FcγRIIIb человека, соответственно,  
при этом, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

17. Полипептид по п. 16, отличающийся тем, что повышенное связывание с Fc $\gamma$ RIIa человека включает более чем 1-кратно, по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 3-кратно, по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, или по меньшей мере 10-кратно увеличенное связывание с Fc $\gamma$ RIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с Fc $\gamma$ RIIa человека.

18. Полипептид по п. 16 или 17, отличающийся тем, что Fc $\gamma$ RIIa человека содержит H131 и, необязательно, повышенное связывание с H131 Fc $\gamma$ RIIa человека включает по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, или по меньшей мере 10-кратно увеличенное связывание с H131 Fc $\gamma$ RIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с H131 Fc $\gamma$ RIIa человека.

19. Полипептид по любому из пп. 16-18, отличающийся тем, что Fc $\gamma$ RIIa человека содержит R131 и, необязательно, повышенное связывание с R131 Fc $\gamma$ RIIa человека включает более чем 1-кратно, по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 3-кратно, по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, или по меньшей мере 10-кратно увеличенное связывание с R131 Fc $\gamma$ RIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с R131 Fc $\gamma$ RIIa человека.

20. Полипептид по любому из пп. 16-19, отличающийся тем, что пониженное связывание с Fc $\gamma$ RIIIb человека включает менее чем 0,9-кратное, менее чем 0,8-кратное, менее чем 0,7-кратное, менее чем 0,6-кратное, или между 0,5-кратным и 0,9-кратным, связывание референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с Fc $\gamma$ RIIIb человека.

21. Полипептид по любому из пп. 1-20, отличающийся тем, что

(1) отношение (i) связывания варианта или полипептида с FcγRIIa человека к (ii) связыванию варианта или полипептида, соответственно, с FcγRIIb человека, является большим, чем

(2) отношение (iii) связывания референсного полипептида с FcγRIIa человека к (iv) связыванию референсного полипептида с FcγRIIb человека, причем референсный полипептид содержит полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, при этом, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

22. Полипептид по п. 21, отличающийся тем, что FcγRIIa человека содержит H131.

23. Полипептид по п. 21 или 22, отличающийся тем, что FcγRIIa человека содержит R131.

24. Полипептид по любому из пп. 21-23, отличающийся тем, что отношение (1) является более чем 1-кратно, по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 3-кратно, по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, по меньшей мере 10-кратно, по меньшей мере 11-кратно, по меньшей мере 12-кратно, по меньшей мере 13-кратно, или по меньшей мере 14-кратно большим, чем отношение (2).

25. Полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмент, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, пролин (P) в положении 292 по EU и лейцин (L) в положении 300 по EU.

26. Полипептид по п. 25, отличающийся тем, что вариант и, необязательно, полипептид, имеет повышенное связывание с FcγRIIIa человека, по сравнению со связыванием референсного полипептида с FcγRIIIa человека, при этом, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

27. Полипептид по п. 26, отличающийся тем, что повышенное связывание с Fc $\gamma$ RIIa человека включает по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 3-кратно, по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, по меньшей мере 10-кратно, по меньшей мере 11-кратно, по меньшей мере 12-кратно, по меньшей мере 13-кратно, или по меньшей мере 14-кратно увеличенное связывание с Fc $\gamma$ RIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с Fc $\gamma$ RIIa человека.

28. Полипептид по п. 26 или п. 27, отличающийся тем, что Fc $\gamma$ RIIa человека содержит H131 и, необязательно, повышенное связывание с H131 Fc $\gamma$ RIIa человека включает по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 3-кратно, по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, по меньшей мере 10-кратно, по меньшей мере 11-кратно, по меньшей мере 12-кратно, по меньшей мере 13-кратно, или по меньшей мере 14-кратно увеличенное связывание с H131 Fc $\gamma$ RIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с H131 Fc $\gamma$ RIIa человека.

29. Полипептид по любому из пп. 25-28, отличающийся тем, что Fc $\gamma$ RIIa человека содержит R131 и, необязательно, повышенное связывание с H131 Fc $\gamma$ RIIa человека включает по меньшей мере 2-кратно увеличенное связывание с R131 Fc $\gamma$ RIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с R131 Fc $\gamma$ RIIa человека.

30. Полипептид по любому из пп. 25-29, отличающийся тем, что

(1) отношение (i) связывания варианта или полипептида с Fc $\gamma$ RIIa человека к (ii) связыванию варианта или полипептида, соответственно, с Fc $\gamma$ RIIb человека,

является большим, чем

(2) отношение (iii) связывания референсного полипептида с Fc $\gamma$ RIIa человека к (iv) связыванию референсного полипептида с Fc $\gamma$ RIIb человека, причем референсный полипептид содержит полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент,

при этом, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

31. Полипептид по п. 30, отличающийся тем, что FcγRIIa человека содержит H131.

32. Полипептид по п. 30 или 31, отличающийся тем, что FcγRIIa человека содержит R131.

33. Полипептид по любому из пп. 30-32, отличающийся тем, что отношение (1) является по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 3-кратно, по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, по меньшей мере 10-кратно, по меньшей мере 11-кратно, по меньшей мере 12-кратно, по меньшей мере 13-кратно, по меньшей мере 14-кратно, или по меньшей мере 15-кратно большим, чем отношение (2).

34. Полипептид по любому из пп. 25-33, отличающийся тем, что вариант имеет повышенное связывание с FcγRIIIa человека, по сравнению со связыванием референсного полипептида с FcγRIIIa человека, при этом, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

35. Полипептид по п. 34, отличающийся тем, что FcγRIII человека содержит V158, F158, или оба.

36. Полипептид по п. 34 или 35, отличающийся тем, что повышенное связывание с FcγRIIIa человека включает более чем 2-кратно, по меньшей мере 2,1-кратно, по меньшей мере 2,2-кратно, по меньшей мере 2,3-кратно, по меньшей мере 2,4-кратно, по меньшей мере 2,5-кратно, по меньшей мере 2,6-кратно, по меньшей мере 2,7-кратно, по меньшей мере 2,8-кратно, по меньшей мере 2,9-кратно, по меньшей мере 3,0-кратно, по меньшей мере 3,1-кратно, по меньшей мере 3,2-кратно, по меньшей мере 3,3-кратно, по меньшей мере 3,4-кратно, по меньшей мере 3,5-кратно, по меньшей мере 3,6-кратно, или по

меньшей мере 3,7-кратно увеличенное связывание с FcγRIIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с FcγRIIIa человека.

37. Полипептид по любому из пп. 25-36, отличающийся тем, что вариант и, необязательно, полипептид, способен связываться с компонентом 1q (C1q) комплемента человека,

при этом, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

38. Полипептид, содержащий вариант полипептида Fc IgG, причем указанный вариант содержит серин (S) в положении 236 по EU, валин (V) в положении 420 по EU, глутаминовую кислоту (E) в положении 446 по EU и треонин (T) в положении 309 по EU.

39. Полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU и пролин (P) в положении 292 по EU.

40. Полипептид по п. 38 или 39, отличающийся тем, что вариант и, необязательно, полипептид, имеет пониженное связывание с FcγRIIb человека

по сравнению со связыванием референсного полипептида с FcγRIIb человека, при этом, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

41. Полипептид по п. 40, отличающийся тем, что пониженное связывание с FcγRIIb человека включает менее чем 0,9-кратное, менее чем 0,8-кратное, менее чем 0,7-кратное, менее чем 0,6-кратное, менее чем 0,5-кратное, или менее чем 0,4-кратное по сравнению со связыванием референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с FcγRIIb человека.

42. Полипептид по любому из пп. 38-41, отличающийся тем, что вариант и, необязательно, полипептид, имеет повышенное связывание с Fc $\gamma$ RIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида с Fc $\gamma$ RIIa человека, при этом, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

43. Полипептид по п. 42, отличающийся тем, что повышенное связывание с Fc $\gamma$ RIIa человека включает более чем 1-кратно, по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 3-кратно, по меньшей мере 4-кратно, или по меньшей мере 5-кратно увеличенное связывание с Fc $\gamma$ RIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с Fc $\gamma$ RIIa человека.

44. Полипептид по п. 42 или 43, отличающийся тем, что Fc $\gamma$ RIIa человека содержит H131.

45. Полипептид по любому из пп. 42-44, отличающийся тем, что Fc $\gamma$ RIIa человека содержит R131.

46. Полипептид по любому из пп. 38-45, отличающийся тем, что  
(1) отношение (i) связывания варианта или полипептида с Fc $\gamma$ RIIa человека к (ii) связыванию варианта или полипептида, соответственно, с Fc $\gamma$ RIIb человека, является большим, чем  
(2) отношение (iii) связывания референсного полипептида с Fc $\gamma$ RIIa человека к (iv) связыванию референсного полипептида с Fc $\gamma$ RIIb человека, причем референсный полипептид содержит полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, при этом, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

47. Полипептид по п. 46, отличающийся тем, что Fc $\gamma$ RIIa человека содержит H131.

48. Полипептид по п. 46 или 47, отличающийся тем, что Fc $\gamma$ RIIIa человека содержит R131.

49. Полипептид по любому из пп. 46-48, отличающийся тем, что отношение (1) является по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 3-кратно, по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 10-кратно, по меньшей мере 11-кратно, или по меньшей мере 12-кратно большим, чем отношение (2).

50. Полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG,

причем указанный вариант содержит пролин (P) в положении 292 по EU и лейцин (L) в положении 300 по EU, и при этом, необязательно, вариант и, дополнительно необязательно, полипептид, имеет повышенное связывание с Fc $\gamma$ RIIIa человека по сравнению со связыванием референсного полипептида с Fc $\gamma$ RIIIa человека, причем, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

51. Полипептид по п. 50, отличающийся тем, что Fc $\gamma$ RIIIa человека содержит V158, F158, или оба, и при этом повышенное связывание с Fc $\gamma$ RIIIa человека включает по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 4,5-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 5,1-кратно, или по меньшей мере 5,2-кратно увеличенное связывание по сравнению со связыванием референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с Fc $\gamma$ RIIIa человека.

52. Полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмент,

причем указанный вариант содержит лейцин (L) в положении 300 по EU.

53. Полипептид, содержащий вариант: полипептида Fc IgG или его фрагмент, причем указанный вариант содержит лизин (K) в положении 345 по EU, серин (S) в положении 236 по EU, тирозин (Y) в положении 235 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 267 по EU.

54. Полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида шарнир-CH2 IgG или (ii) полипептида шарнир-Fc IgG или его фрагмент,

причем указанный вариант содержит аргинин (R) в положении 272 по EU, треонин (T) в положении 309 по EU, тирозин (Y) в положении 219 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 267 по EU.

55. Полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмент,

причем указанный вариант содержит тирозин (Y) или триптофан (W) в положении 236 по EU.

56. Полипептид, содержащий вариант: (i) полипептида CH2 IgG или (ii) полипептида Fc IgG или его фрагмент, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, при этом полипептид CH2 IgG согласно (i) или полипептид Fc IgG или его фрагмент согласно (ii) и, необязательно, полипептид, является афукозилированным,

при этом, дополнительно необязательно, вариант содержит лейцин (L) в положении 330 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 332 по EU, при этом, еще дополнительно необязательно, вариант не содержит аспарагиновую кислоту (D) в положении 239 по EU и, еще дополнительно необязательно, содержит серин (S) в положении 239 по EU.

57. Полипептид, содержащий вариант: полипептида Fc IgG или его фрагмент, причем указанный вариант содержит

(1) лейцин (L) в положении 243 по EU, глутаминовую кислоту (E) в положении 446 по EU, лейцин (L) в положении 396 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 267 по EU; или

(2) аланин (A) в положении 236 по EU, аспарагиновую кислоту (D) в положении 239 по EU, глутаминовую кислоту (E) в положении 332 по EU, лейцин (L) в положении 428 по EU и серин (S) или аланин (A) в положении 434 по EU.

58. Полипептид по любому из пп. 50-57, отличающийся тем, что полипептид имеет повышенное связывание с C1q человека

по сравнению со связыванием референсного полипептида с C1q человека, при этом, необязательно, связывание определяют с использованием электрохемилюминесцентного анализа, дополнительно необязательно, системы Meso Scale Discovery.

59. Полипептид по п. 58, отличающийся тем, что повышенное связывание с C1q человека включает более чем 1-кратно, по меньшей мере 1,5-кратно, по меньшей мере 1,75-кратно, по меньшей мере 1,9-кратно, по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 2,1-кратно, по меньшей мере 2,2-кратно, по меньшей мере 2,3-кратно, по меньшей мере 2,4-кратно, по меньшей мере 2,5-кратно, по меньшей мере 2,6-кратно, по меньшей мере 2,7-кратно, по меньшей мере 2,8-кратно, по меньшей мере 2,9-кратно, по меньшей мере 3,0-кратно, по меньшей мере 3,1-кратно, по меньшей мере 3,2-кратно, по меньшей мере 3,3-кратно, по меньшей мере 3,4-кратно, по меньшей мере 3,5-кратно, по меньшей мере 3,6-кратно, по меньшей мере 3,7-кратно, по меньшей мере 3,8-кратно, по меньшей мере 3,9-кратно, по меньшей мере 4,0-кратно, по меньшей мере 4,1-кратно, или по меньшей мере 4,15-кратно увеличенное связывание с C1q человека по сравнению со связыванием референсного полипептида, содержащего полипептид Fc IgG человека дикого типа или его фрагмент, с C1q человека.

60. Полипептид по любому из пп. 1-59, который:

(i) способен связываться с Fc $\gamma$ RIIIa человека, причем Fc $\gamma$ RIIIa человека содержит V158, F158, или оба;

(ii) способен связываться с Fc $\gamma$ RIIIb человека;

(iii) способен связываться с FcRn человека, необязательно при pH 6;

(iv) способен связываться с компонентом Iq (C1q) комплемента человека;

(v) имеет более высокую Tm и/или может продуцироваться с более высоким титром по сравнению с

(1) референсным полипептидом, содержащим полипептид Fc IgG1 человека, содержащий аминокислотные замены G236A, S239D, A330L и I330E (нумерация EU) и, необязательно, не содержащий каких-либо других аминокислотных замен по сравнению с полипептидом Fc IgG1 человека дикого типа,

- (2) референсным полипептидом, содержащим полипептид Fc IgG1 человека, содержащий аминокислотные замены G236A, A330L и I330E (нумерация EU) и, необязательно, дополнительно содержащий мутации M428L и N434S или мутации M428L и N434A и/или не содержащий каких-либо других аминокислотных замен и/или не содержащий S239D, по сравнению с полипептидом Fc IgG1 человека дикого типа,
- (3) референсным полипептидом, содержащим полипептид Fc IgG1 человека, содержащий аминокислотные замены G236A или G236S (нумерация EU) и, необязательно, не содержащий каких-либо других аминокислотных замен по сравнению с полипептидом Fc IgG1 человека дикого типа, и/или
- (4) референсным полипептидом, содержащим полипептид Fc IgG1 человека, содержащий аминокислотные замены A330L и I332E (нумерация EU) и, необязательно, не содержащий каких-либо других аминокислотных замен по сравнению с полипептидом Fc IgG1 человека дикого типа;

(vi) способен стимулировать сигнализацию через FcγRa в клетке-хозяине, причем, необязательно, (a) сигнализация необязательно является повышенной по сравнению с сигнализацией, стимулируемой референсным полипептидом и/или (b) FcγRa содержит H131 FcγRIIa, R131 FcγRIIa, V158 FcγRIIIa, F158 FcγRIIIa, или любую их комбинацию;

(vii) по меньшей мере в составе антитела способен стимулировать антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦТ);

(viii) по меньшей мере в составе антитела способен стимулировать антитело-зависимый фагоцитоз (АЗКФ);

(ix) по меньшей мере в составе антитела способен стимулировать комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ);

(x) по меньшей мере в составе антитела способен образовывать иммунный комплекс; или

(xi) любую комбинацию (i)-(x).

61. Полипептид по любому из пп. 1-60, отличающийся тем, что полипептид содержит антитело и антитело способно на любое одно или несколько из следующего:

(i) увеличение специфического лизиса (например, посредством АЗКЦТ) естественными киллерными клетками и/или МНКПК (например, экспрессирующими F158/V158 или V158/V158 Fc $\gamma$ RIIIA) против антиген-экспрессирующих клеток-мишеней, по сравнению с антителом, содержащим референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования (например, антитело, содержащее Fc IgG1 человека, содержащий мутации G236A, A330L и I332E);

(ii) увеличение АЗКФ моноцитами (например, CD14+ моноцитами, необязательно экспрессирующими F158/V158 Fc $\gamma$ RIIA и R131/H131 Fc $\gamma$ RIIA или F158/F158 Fc $\gamma$ RIIA и R131/H131 Fc $\gamma$ RIIA) против антиген-экспрессирующих клеток-мишеней, по сравнению с антителом, содержащим референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования;

(iii) увеличение процента клеток CD83+ (например, моДК) и/или увеличение экспрессии CD83 из моДК в образце при введении в комбинации с антигеном, по сравнению с антителом, содержащим референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования, при введении в комбинации с антигеном;

(iv) увеличение продуцирования одного или нескольких цитокинов (необязательно выбранных из группы, состоящей из IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 и TNF- $\alpha$ ) из моДК в образце при введении в комбинации с антигеном, по сравнению с антителом, содержащим референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования, при введении в комбинации с антигеном; и

(v) увеличение способности моДК стимулировать антиген-специфические CD4+ Т-клетки при введении к моДК в комбинации с антигеном, по сравнению с антителом, содержащим референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования, при введении к моДК в комбинации с антигеном, причем, необязательно, (1) моДК и CD4+ Т-клетки получены от одного и того же (необязательно вакцинированного антигеном) субъекта и/или (2) стимуляцию антигенспецифических CD4+ Т-клеток определяют по повышению экспрессии CD25 и/или повышению пролиферации (например, при определении по снижению окрашивания CFSE со временем) и/или повышению экспрессии CD69 и/или повышению экспрессии NFAT и/или повышению экспрессии CD44, антигенспецифическими CD4+ Т-клетками.

62. Полипептид по любому из пп. 1-61, отличающийся тем, что вариант дополнительно содержит одну или несколько модификаций, которые усиливают или дополнительно усиливают связывание с FcRn человека

по сравнению с (1) референсным полипептидом, который содержит полипептид Fc IgG1 человека дикого типа и/или с (2) полипептидом по любому из пп. 1-61 без одной или нескольких модификаций.

63. Полипептид по п. 62, отличающийся тем, что одна или несколько модификаций, которые усиливают связывание с FcRn человека, включают аминокислотные замены:

- (i) M428L/N434S;
- (ii) M252Y/S254T/T256E;
- (iii) T250Q/M428L;
- (iv) P257I/Q311I;
- (v) P257I/N434H;
- (vi) D376V/N434H;
- (vii) T307A/E380A/N434A;
- (viii) N434A;
- (ix) M428L/N434A; или
- (x) любую комбинацию (i)-(ix).

64. Полипептид по любому из пп. 1-63, отличающийся тем, что вариант не содержит каких-либо дополнительных мутаций по сравнению с референсным полипептидом Fc IgG или его фрагментом, полипептидом CH2 IgG, полипептидом шарнир-CH2 IgG, или полипептидом шарнир-Fc IgG или его фрагментом, соответственно.

65. Полипептид по любому из пп. 1-64, который содержит полипептид Fc.

66. Полипептид по любому из пп. 1-65, который представляет собой мономер, состоящий из димера полипептида (например, димера Fc).

67. Полипептид по любому из пп. 1-66, который представляет собой мономер, состоящий из гомодимера полипептида (например, гомодимера Fc).

68. Полипептид по любому из пп. 1-66, который представляет собой мономер, состоящий из гетеродимера полипептида (например, гетеродимера Fc, необязательно содержащего выступ в первом Fc гетеродимера и соответствующую полость во втором Fc гетеродимера, и/или содержащего одну или несколько мутаций которые обеспечивают или создают противоположный заряд в каждом из двух мономеров Fc (например, положительный заряд в области первого мономера и отрицательный заряд в соответствующей области второго мономера), и/или содержащего гетерологичную аминокислотную последовательность в одном или обоих мономерах, для стимулирования димеризации двух мономеров Fc).

69. Полипептид по любому из пп. 1-68, который входит в состав антитела.

70. Антитело, содержащее полипептид по любому из пп. 1-69.

71. Антитело, содержащее вариант Fc IgG, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU и лейцин (L) в положении 300 по EU.

72. Антитело, содержащее вариант Fc IgG, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, валин (V) в положении 328 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 295 по EU.

73. Антитело, содержащее вариант шарнира-Fc IgG, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, аланин (A) в положении 230 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 295 по EU.

74. Антитело, содержащее вариант Fc IgG, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, пролин (P) в положении 292 по EU и аспарагин (N) в положении 377 по EU.

75. Антитело, содержащее вариант Fc IgG, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, аланин (A) в положении 334 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 295 по EU.

76. Антитело, содержащее вариант Fc IgG, причем указанный вариант содержит серин (S) в положении 236 по EU, пролин (P) в положении 292 по EU и лейцин (L) в положении 300 по EU.

77. Антитело, содержащее вариант Fc IgG, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, пролин (P) в положении 292 по EU и лейцин (L) в положении 300 по EU.

78. Антитело, содержащее вариант Fc IgG, причем указанный вариант содержит серин (S) в положении 236 по EU, валин (V) в положении 420 по EU, глутаминовую кислоту (E) в положении 446 по EU и треонин (T) в положении 309 по EU.

79. Антитело, содержащее вариант Fc IgG, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU и лейцин (L) в положении 300 по EU.

80. Антитело, содержащее вариант Fc IgG, причем указанный вариант содержит пролин (P) в положении 292 по EU и лейцин (L) в положении 300 по EU.

81. Антитело, содержащее вариант Fc IgG, причем указанный вариант содержит лейцин (L) в положении 300 по EU.

82. Антитело, содержащее вариант Fc IgG, причем указанный вариант содержит лизин (K) в положении 345 по EU, серин (S) в положении 236 по EU, тирозин (Y) в положении 235 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 267 по EU.

83. Антитело, содержащее вариант шарнира-Fc IgG, причем указанный вариант содержит аргинин (R) в положении 272 по EU, треонин (T) в положении 309 по EU, тирозин (Y) в положении 219 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 267 по EU.

84. Антитело, содержащее вариант Fc IgG, причем указанный вариант содержит тирозин (Y) или триптофан (W) в положении 236 по EU.

85. Антитело, содержащее вариант Fc IgG, причем указанный вариант содержит аланин (A) в положении 236 по EU, при этом полипептид Fc IgG или его фрагмент и, необязательно, антитело, является афукозилированным,

и при этом, дополнительно необязательно, вариант содержит лейцин (L) в положении 330 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 332 по EU, при этом, еще дополнительно необязательно, вариант не содержит аспарагиновую кислоту (D) в положении 239 по EU и, еще дополнительно необязательно, содержит серин (S) в положении 239 по EU.

86. Антитело, содержащее вариант Fc IgG, причем указанный вариант содержит:

(1) лейцин (L) в положении 243 по EU, глутаминовую кислоту (E) в положении 446 по EU, лейцин (L) в положении 396 по EU и глутаминовую кислоту (E) в положении 267 по EU; или

(2) аланин (A) в положении 236 по EU, аспарагиновую кислоту (D) в положении 239 по EU, глутаминовую кислоту (E) в положении 332 по EU, лейцин (L) в положении 428 по EU и серин (S) или аланин (A) в положении 434 по EU.

87. Полипептид по любому из пп. 1-69 или антитело по любому из пп. 70-86, отличающиеся тем, что вариант получен из, или содержит, изотип IgG1, изотип IgG2, изотип IgG3 или изотип IgG4.

88. Полипептид по любому из пп. 1-68 и 87, или антитело по любому из пп. 70-87, отличающиеся тем, что вариант получен из, или содержит, Fc человека или его фрагмент, или из тяжелой цепи антитела человека или ее фрагмента.

89. Полипептид по любому из пп. 1-69, 87 и 88, или антитело по любому из пп. 70-88, отличающиеся тем, что вариант получен из, или содержит, изотип IgG1 человека, изотип IgG2 человека, изотип IgG3 человека или изотип IgG4 человека.

90. Полипептид по любому из пп. 1-69 и 87-89, или антитело по любому из пп. 70-89, отличающийся тем, что вариант получен из, или содержит, изотип IgG1 человека, необязательно содержащий аллотип G1m3, аллотип G1m17, аллотип G1m3,1 или аллотип G1m17,1.

91. Антитело по любому из пп. 70-90, которое:

(i) способно связываться с FcγRIIIa человека, причем FcγRIIIa человека содержит V158, F158, или оба;

(ii) способно связываться с FcγRIIIb человека;

(iii) способно связываться с FcRn человека, необязательно при pH 6;

(iv) способно связываться с компонентом 1q (C1q) комплемента человека, необязательно со связыванием, которое повышено более чем 1-кратно, по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 3-кратно, или по меньшей мере 4-кратно по сравнению со связыванием антитела, содержащего референсный полипептид Fc;

(v) имеет более высокую T<sub>m</sub>, и/или может продуцироваться с более высоким титром, и/или способно связываться с FcγRIIIa человека (необязательно, H131 и/или R131) с более высокой аффинностью и/или авидностью, и/или способно связываться с FcγRIIIb человека с более низкой аффинностью и/или авидностью,

по сравнению с

(1) референсным антителом, которое содержит Fc IgG1 человека, содержащий аминокислотные замены G236A, S239D, A330L и I330E (нумерация EU), причем референсное антитело необязательно не содержит каких-либо других аминокислотных замен в Fc по сравнению с Fc IgG1 человека дикого типа,

(2) референсным антителом, которое содержит Fc IgG1 человека, содержащий аминокислотные замены G236A, A330L и I330E (нумерация EU), причем референсное антитело необязательно (a) дополнительно содержит мутации M428L и N434S или мутации M428L и N434A и/или (b) не содержит каких-либо других аминокислотных замен в Fc по сравнению с Fc IgG1 человека дикого типа и/или (c) не содержит мутацию S239D,

(3) референсным антителом, содержащим Fc IgG1 человека, который содержит аминокислотную замену G236A или G236S (нумерация EU) и, необязательно, не содержит каких-либо других аминокислотных замен в Fc по сравнению с Fc IgG1 человека дикого типа,

(4) референсным антителом, которое содержит Fc IgG1 человека, содержащий аминокислотные замены A330L и I332E (нумерация EU), причем референсное антитело необязательно не содержит

каких-либо других аминокислотных замен в Fc по сравнению с Fc IgG1 человека дикого типа; и/или

(5) референсным антителом, содержащим Fc IgG1 человека дикого типа;

(vi) способно стимулировать сигнализацию через FcγRa в клетке-хозяине, причем, необязательно, (a) сигнализация повышена по сравнению с сигнализацией, стимулируемой референсным антителом и/или (b) при этом FcγRa включает H131 FcγRIIa, R131 FcγRIIa, V158 FcγRIIa, F158 FcγRIIa, или любую их комбинацию;

(vii) способно стимулировать антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦТ);

(viii) способно стимулировать антитело-зависимый фагоцитоз (АЗКФ);

(ix) способно стимулировать комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ);

(x) способно образовывать иммунный комплекс; или

(xi) любую комбинацию (i)-(x).

92. Антитело по любому из пп. 70-91, отличающееся тем, что способно на любое одно или несколько из следующего:

(i) увеличение специфического лизиса (например, посредством АЗКЦТ) естественными киллерными клетками и/или МНКПК (например, экспрессирующими F158/V158 или V158/V158 FcγRIIa) против антиген-экспрессирующих клеток-мишеней, по сравнению с антителом, содержащим референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования (например, антитело, содержащее Fc IgG1 человека, содержащий мутации G236A, A330L и I332E);

(ii) увеличение АЗКФ моноцитами (например, CD14+ моноцитами, необязательно экспрессирующими F158/V158 FcγRIIa и R131/H131 FcγRIIa или F158/F158 FcγRIIa и R131/H131 FcγRIIa) против антиген-экспрессирующих клеток-мишеней, по сравнению с антителом, содержащим референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования;

(iii) увеличение процента клеток CD83+ (например, моДК) и/или увеличение экспрессии CD83 из моДК в образце при введении в комбинации с антигеном, по сравнению с антителом, содержащим референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования, при введении в комбинации с антигеном;

(iv) увеличение продуцирования одного или нескольких цитокинов (необязательно выбранных из группы, состоящей из IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 и TNF- $\alpha$ ) из моДК в образце при введении в комбинации с антигеном, по сравнению с антителом, содержащим референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования, при введении в комбинации с антигеном; и

(v) увеличение способности моДК стимулировать антиген-специфические CD4+ T-клетки при введении к моДК в комбинации с антигеном, по сравнению с антителом, содержащим референсный полипептид Fc, не содержащий мутацию (мутации) и/или состояние фукозилирования, при введении к моДК в комбинации с антигеном, причем, необязательно, (1) моДК и CD4+ T-клетки получены от одного и того же (необязательно вакцинированного антигеном) субъекта и/или (2) стимуляцию антигенспецифических CD4+ T-клеток определяют по повышению экспрессии CD25 и/или повышению пролиферации (например, при определении по снижению окрашивания CFSE со временем) и/или повышению экспрессии CD69 и/или повышению экспрессии NFAT и/или повышению экспрессии CD44, антигенспецифическими CD4+ T-клетками.

93. Антитело по любому из пп. 70-92, отличающееся тем, что вариант дополнительно содержит одну или несколько модификаций, которые усиливают связывание с FcRn человека

по сравнению с (1) референсным антителом, которое содержит полипептид Fc IgG1 человека дикого типа и/или с (2) антителом по любому из пп. 70-92 без одной или нескольких модификаций.

94. Антитело по п. 93, отличающееся тем, что одна или несколько модификаций, которые усиливают связывание с FcRn человека, включают аминокислотные замены:

- (i) M428L/N434S;
- (ii) M252Y/S254T/T256E;
- (iii) T250Q/M428L;
- (iv) P257I/Q311I;
- (v) P257I/N434H;
- (vi) D376V/N434H;
- (vii) T307A/E380A/N434A;
- (viii) M428L/N434A; или

любую комбинацию (i)-(viii).

95. Антитело по любому из пп. 70-94, отличающееся тем, что вариант не содержит каких-либо дополнительных мутаций по сравнению с референсным Fc IgG дикого типа.

96. Полипептид по п. 69, или антитело по любому из пп. 70-95, отличающиеся тем, что антитело способно специфически связываться с:

(i) мишенью (например, антигеном), которая экспрессируется или продуцируется патогеном (например, вирусом, бактерией, паразитом, грибком) или клеткой, инфицированной патогеном, причем, необязательно, патоген включает вирус и указанный вирус включает: коронавирус; бетакоронавирус; сарбековир; эмбековир; нобековир; мербековир; метапневмовирус; гибековир; SARS-CoV-2; вирус гепатита В; вирус гепатита D; вирус гриппа А; цитомегаловирус; риновирус; вирус гепатита С; вирус гриппа В; вирус иммунодефицита человека; респираторный вирус; респираторно-синцитиальный вирус; вирус Зика; вирус бешенства; вирус денге; флавивирус; эболавир; или любую их комбинацию;

(ii) мишенью (например, антигеном), которая экспрессируется, и/или экспрессирована на клеточной поверхности опухолевой клетки, необязательно, раковой клетки или клетки пролиферативного или гиперпролиферативного расстройства;

(iii) мишенью (например, антигеном), которая ассоциирована с аутоиммунным заболеванием;

(iv) мишенью (например, антигеном), которая ассоциирована с нейродегенеративным заболеванием;

(v) сигнальной молекулой иммунной системы, такой как цитокин;

(vi) мишенью (например, антигеном), которая ассоциирована с воспалением;

(vii) мишенью (например, антигеном), которая ассоциирована с неинфекционным заболеванием; или

(viii) любой комбинацией (i)-(vii).

97. Полипептид по любому из пп. 69, 87-90 и 96, или антитело по любому из пп. 70-96, которое включает химерное антитело, гуманизированное антитело, нейтрализующее антитело, антитело человека, IgNAR, нанотело, полученное от верблюдовых, или любую их комбинацию.

98. Полипептид по любому из пп. 69, 87-90, 96 и 97, или антитело по любому из пп. 70-96, отличающееся тем, что антитело представляет собой мультиспецифическое антитело, такое как биспецифическое антитело, триспецифическое антитело или тетраспецифическое антитело.

99. Полипептид по любому из пп. 69, 87-90 и 96-98, или антитело по любому из пп. 70-98, отличающееся тем, что антитело входит в состав конъюгата антитела.

100. Полипептид по любому из пп. 1-69, 87-90 и 96-99, или антитело по любому из пп. 70-99, отличающиеся тем, что полипептид или полипептид Fc: (1) содержит слитый белок Fc; и/или (2) содержит Fcab.

101. Полипептид или антитело по п. 100, отличающиеся тем, что слитый белок Fc дополнительно содержит:

(i) рецепторный домен (например, эктодомен рецепторного белка, или его лигандсвязывающий участок);

(ii) лиганд;

(iii) замещающий белок; или

(iv) любую комбинацию (i)-(iii).

102. Полипептид по любому из пп. 1-69, 87-90 и 96-101, или антитело по любому из пп. 70-101, которые конъюгированы, связаны или слиты с фрагментом полезной нагрузки.

103. Полипептид или антитело по п. 102, отличающиеся тем, что фрагмент полезной нагрузки включает: антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; цитотоксический агент (например, химиотерапевтический агент); детектируемое соединение или детектируемую метку; олигонуклеотид (например, антисмысловый олигонуклеотид, миРНК и т.п.); вектор; агент, который стимулирует иммунный ответ; фактор роста; или любую их комбинацию.

104. Полипептид по любому из пп. 1-69, 87-90 и 96-103, или антитело по любому из пп. 70-103, которые: являются афукозилированными; были продуцированы в клетке-хозяине, неспособной к фукозилированию или с ингибированной способностью

фукозилировать полипептид; были продуцированы в условиях, которые ингибируют их фукозилирование клеткой-хозяином; или любая их комбинация.

105. Полипептид по любому из пп. 1-69, 87-90 и 96-104, или антитело по любому из пп. 70-104, содержащие аминокислотную мутацию, которая (1) ингибирует фукозилирование по сравнению с референсным полипептидом или антителом, соответственно, и/или (2) которая подавляет сайт фукозилирования, присутствующий в референсном полипептиде или антителе, соответственно.

106. Полинуклеотид, кодирующий полипептид по любому из пп. 1-69, 87-90 и 96-105, или антитело по любому из пп. 70-105.

107. Полинуклеотид по п. 106, отличающийся тем, что полинуклеотид оптимизирован по кодонам для экспрессии клеткой-хозяином.

108. Какой-либо (например, экспрессионный) вектор, содержащий полинуклеотид по п. 106 или 107.

109. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п. 106 или 107.

110. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 108.

111. Клетка-хозяин, экспрессирующая: полипептид по любому из пп. 1-69, 87-90 и 96-105; и/или антитело по любому из пп. 70-105.

112. Композиция, содержащая:

(i) полипептид по любому из пп. 1-69, 87-90 и 96-105; и/или

(ii) антитело по любому из пп. 70-105; и/или

(iii) полинуклеотид по п. 106 или 107; и/или

(iv) вектор по п. 108; и/или

(v) клетка-хозяин по любому из пп. 109-111,

и фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель.

113. Способ лечения или предотвращения заболевания или расстройства у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества:

- (i) полипептида по любому из пп. 1-69, 87-90 и 96-105;
- (ii) антитела по любому из пп. 70-105;
- (iii) полинуклеотида по п. 106 или 107;
- (iv) вектора по п. 108;
- (v) клетки-хозяина по любому из пп. 109-111; и/или
- (vi) композиции по п. 112.

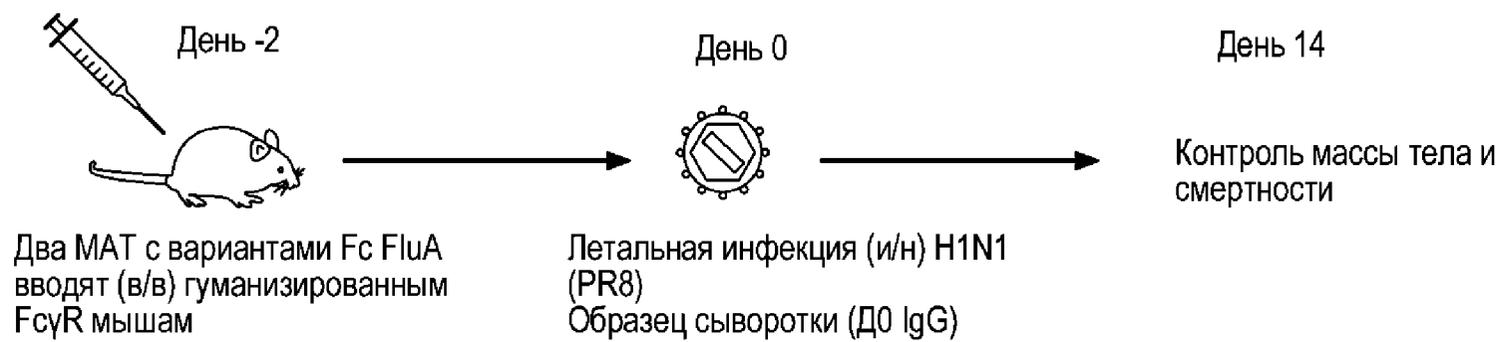
114. Полипептид по любому из пп. 1-69, 87-90 и 96-105, антитело по любому из пп. 70-105, полинуклеотид по п. 106 или 107, вектор по п. 108, клетка-хозяин по любому из пп. 109-111 и/или композиция по п. 112, для использования в лечении или предотвращении заболевания или расстройства у субъекта.

115. Полипептид по любому из пп. 1-69, 87-90 и 96-105, антитело по любому из пп. 70-105, полинуклеотид по п. 106 или 107, вектор по п. 108, клетка-хозяин по любому из пп. 109-111 и/или композиция по п. 112, для использования в производстве медикамента для лечения или предотвращения заболевания или расстройства у субъекта.

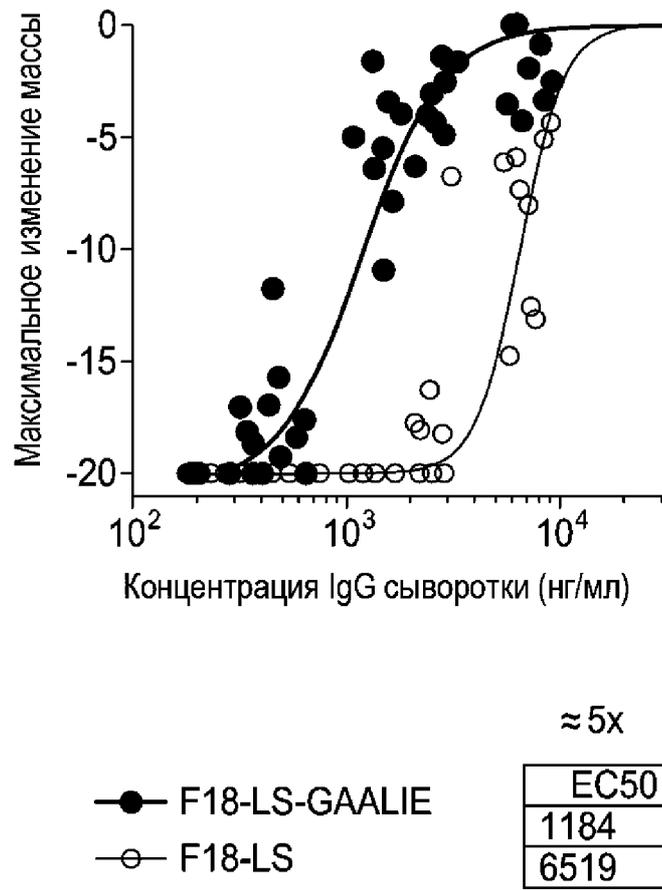
116. Способ по п. 113 или полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетка-хозяин и/или композиция для использования по п. 114 или 115, отличающиеся тем, что заболевание включает инфекционное заболевание (необязательно вызываемое вирусной, бактериальной, грибковой или паразитарной инфекцией), раковое заболевание, пролиферативное расстройство, нейродегенеративное заболевание, аутоиммунное заболевание или любую их комбинацию.

117. Способ по п. 116 или полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетка-хозяин и/или композиция для использования по п. 116, отличающиеся тем, что инфекционное заболевание включает: коронавирусную инфекцию, бетакоронавирусную инфекцию, сарбековиральную инфекцию, эмбековиральную инфекцию, нобековиральную инфекцию, мербековиральную инфекцию, метапневмовирусную инфекцию, гибоковиральную инфекцию, инфекцию SARS-CoV-2, инфекцию вируса гепатита В, инфекцию вируса гепатита D, инфекцию вируса гепатита С, цитомегаловирусную

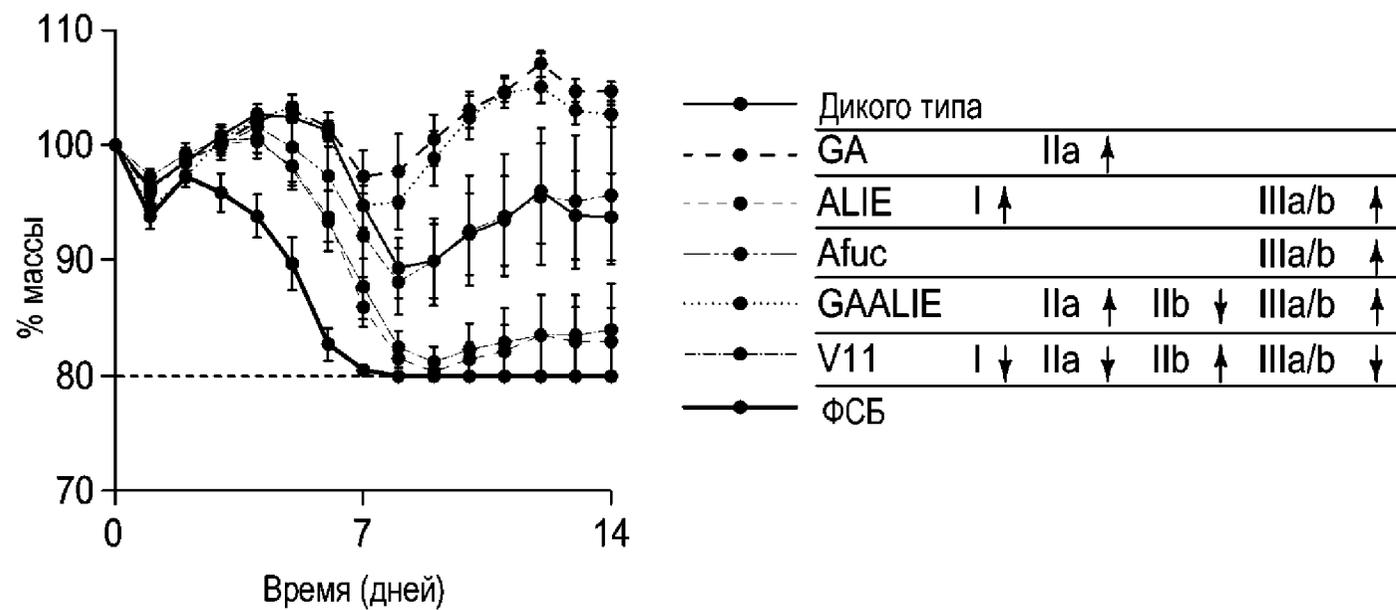
инфекцию, инфекцию вируса гриппа А, инфекцию вируса гриппа В, инфекцию вируса иммунодефицита человека, респираторную вирусную инфекцию, респираторно-синцитиальную вирусную инфекцию, инфекцию вируса Зика, инфекцию вируса бешенства, инфекцию вируса денге, флавивирусную инфекцию, эболавирусную инфекцию или любую их комбинацию.



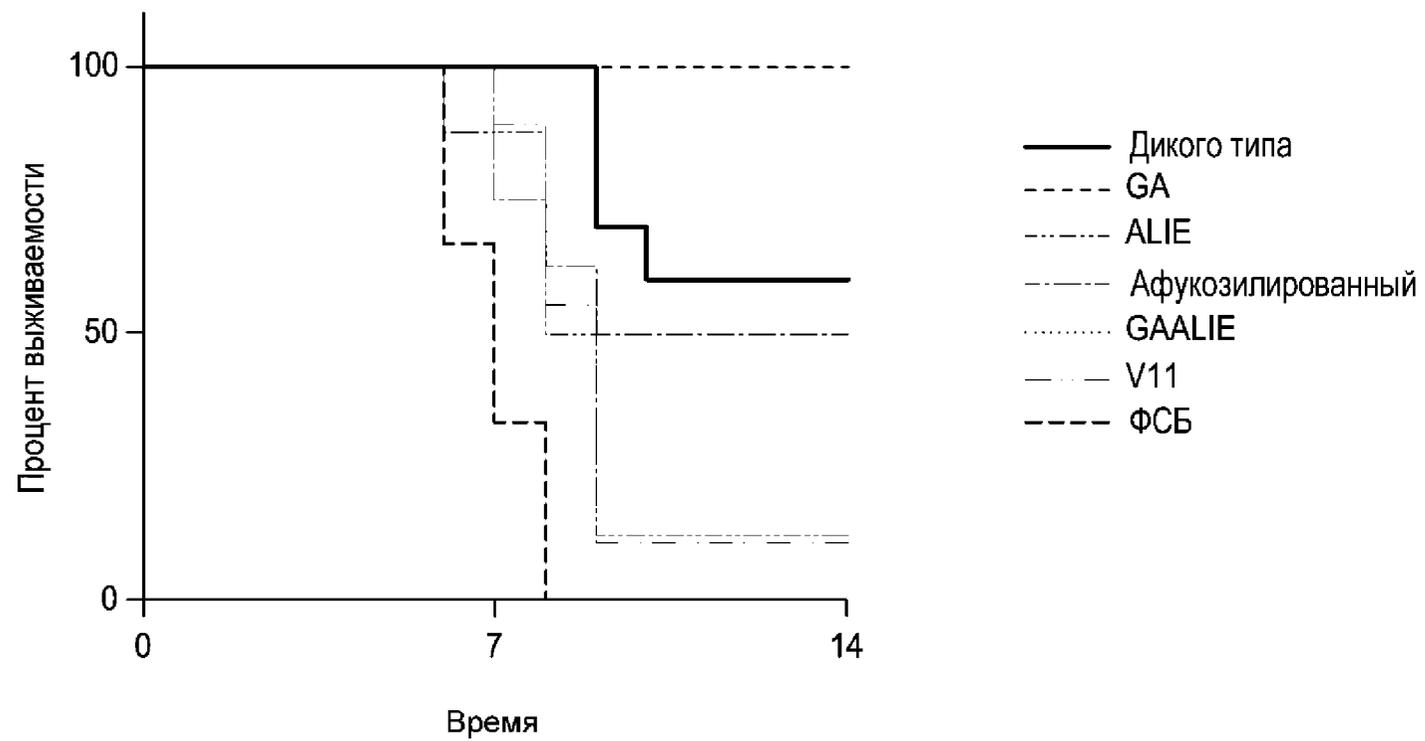
Фиг. 1А



Фиг. 1В



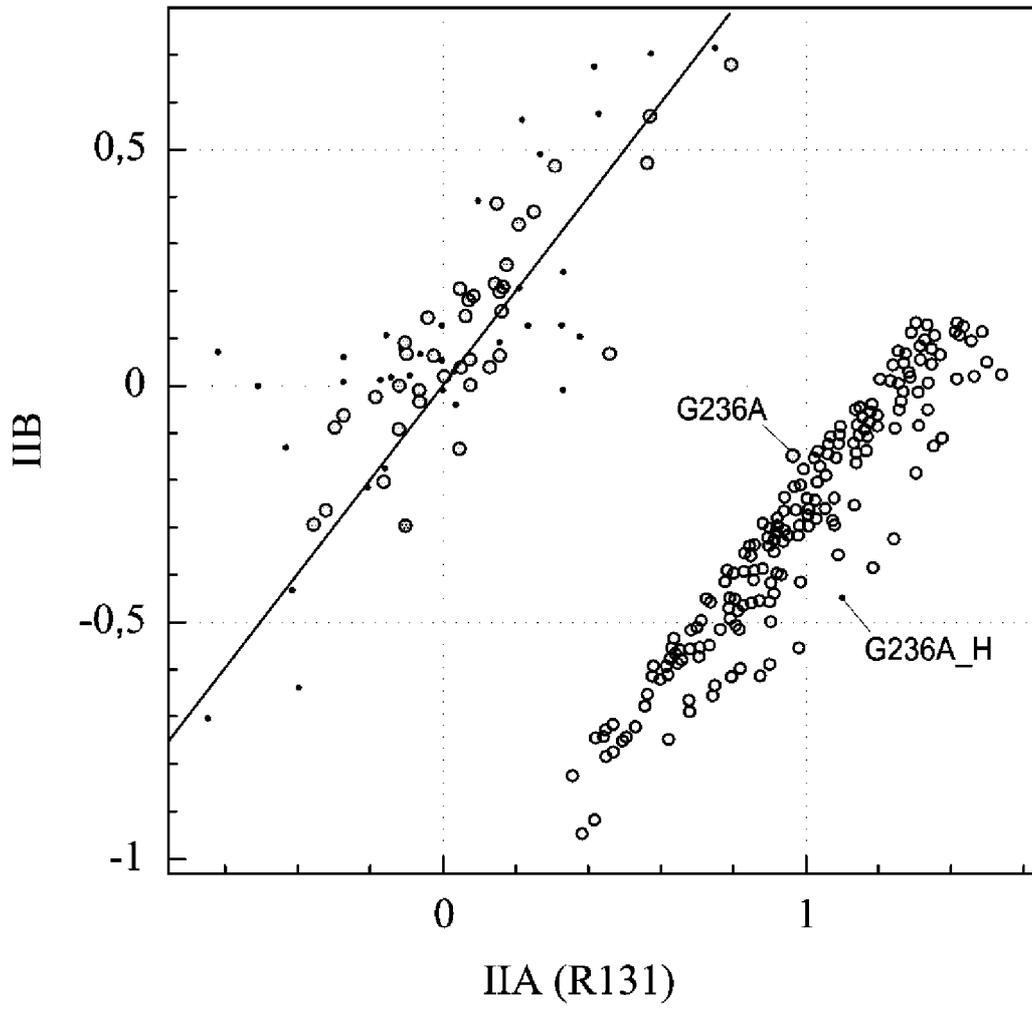
Фиг. 1С



Фиг. 1D

Вариант Fc	FcγRI	FcγRIIa	FcγRIIb	FcγRIIIa/b
DT	++++	++	++	++
GRLR	—	—	—	—
GA	+++	+++++	++	++
ALIE	+++++	++	++	+++++
Afuc	++++	++	++	+++++
GAALIE	++++	+++++	+	+++++
V11	+	+	+++++	—

Фиг. 1Е

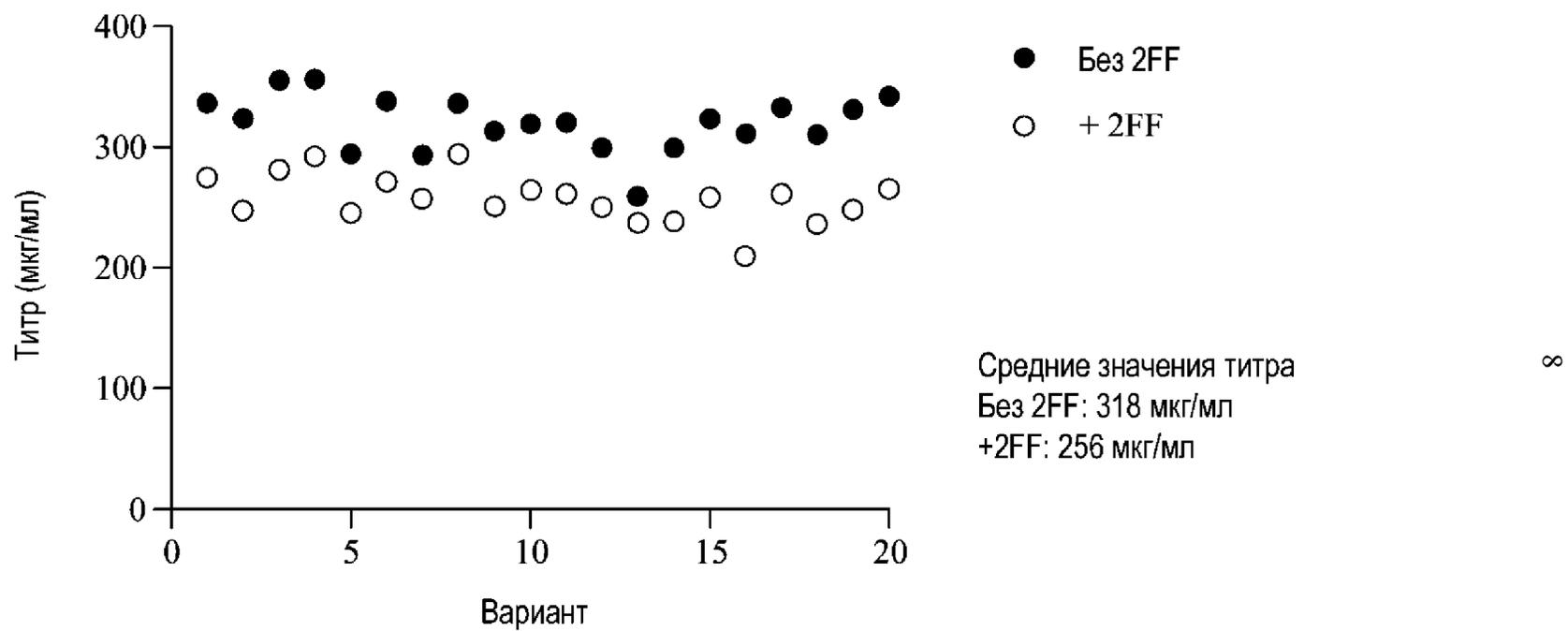


Фиг. 2

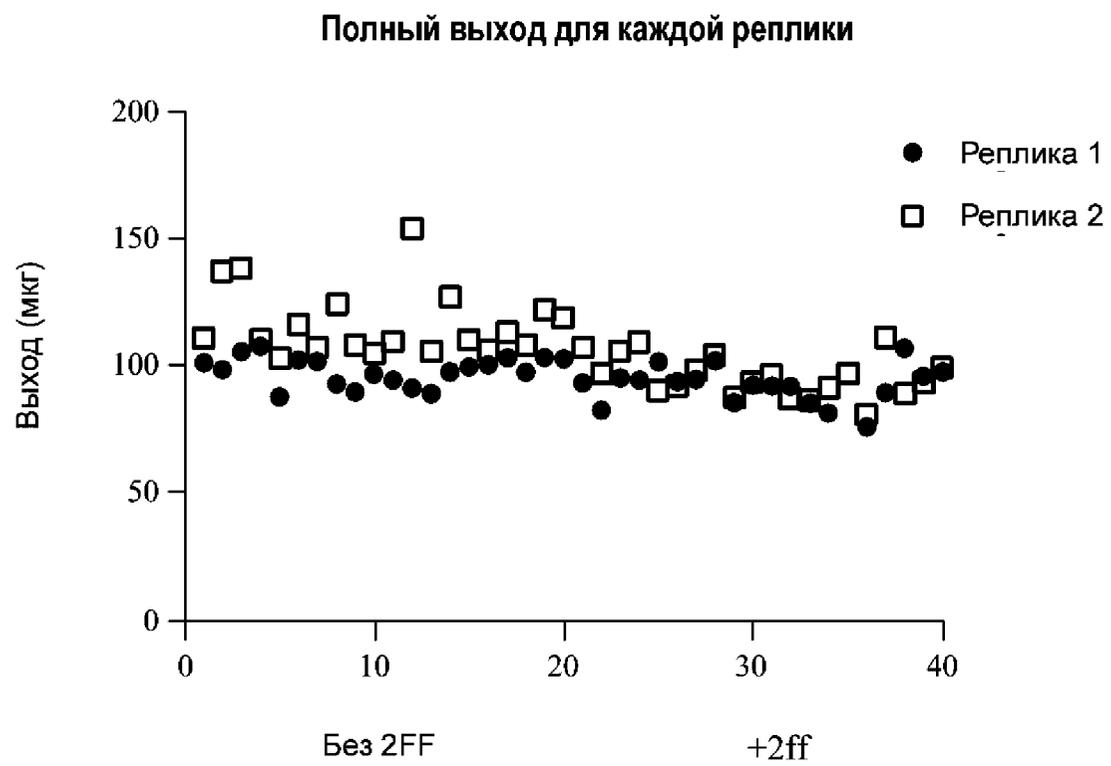
	IIA_H	IIБ	IIA_R	IIIA_V	IIIA_F	IIБ	FcRn	IIA/IIБ	титр мг/мл	Tm (°C)
G236A_A330L_I332E	4,3	0,61	1,62	2,38	13,35	1,98	0,93		-0,0039	-13,305
G236A_A330L_I332E	2,91	0,60	1,19	1,69	11,25	1,6	0,94		-0,0181	-13,725
G236A_E272Y_S298N	0,63	0,19	0,38	0,06	0,31	0,62	0,98	3,24	0,0255	-2,985
G236A_K334A_Q295E	5,01	0,4	2,88	0,27	0,74	0,72	1,02	12,59	0,0245	-8,055
G236A_L328V_Q295E	7,76	0,81	10,72	0,36	0,52	0,71	1,07	9,55	0,0145	-11,265
G236A_P230A_Q295E	7,59	0,48	4,57	0,31	0,48	0,72	0,93	15,85	0,0245	-6,185
G236A_Q295E_S298N	1,82	0,23	0,65	0,07	0,35	0,76	0,93	7,76	0,0425	-3,225
K334A_Q295E_S298N	0,22	0,47	0,28	0,09	0,37	0,93	0,91	0,47		
L234D_G236D_K326E	0,14	0,28	0,3	0,05	0,35	0,6	0,83	0,51		
L234D_V264R_K326E	0,14	0,5	0,25	0,05	0,27	0,6	0,83	0,28		
L328V_Q295E_S298N	0,26	0,32	0,33	0,08	0,28	0,79	1,02	0,79		
P245A_Q295E_S298N	0,28	0,31	0,3	0,1	0,34	0,89	0,85	0,91		

7

Фиг. 3



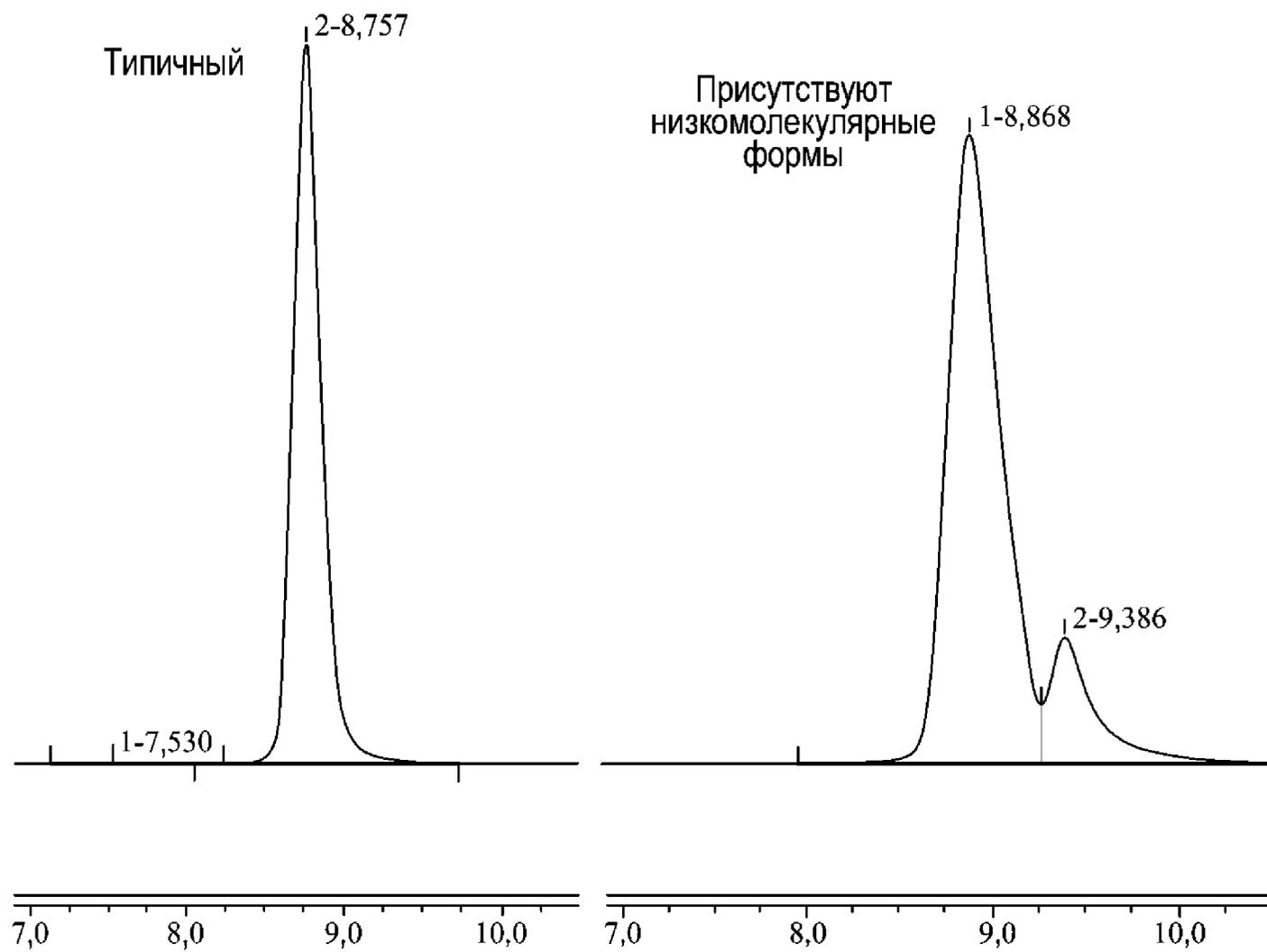
Фиг. 4А



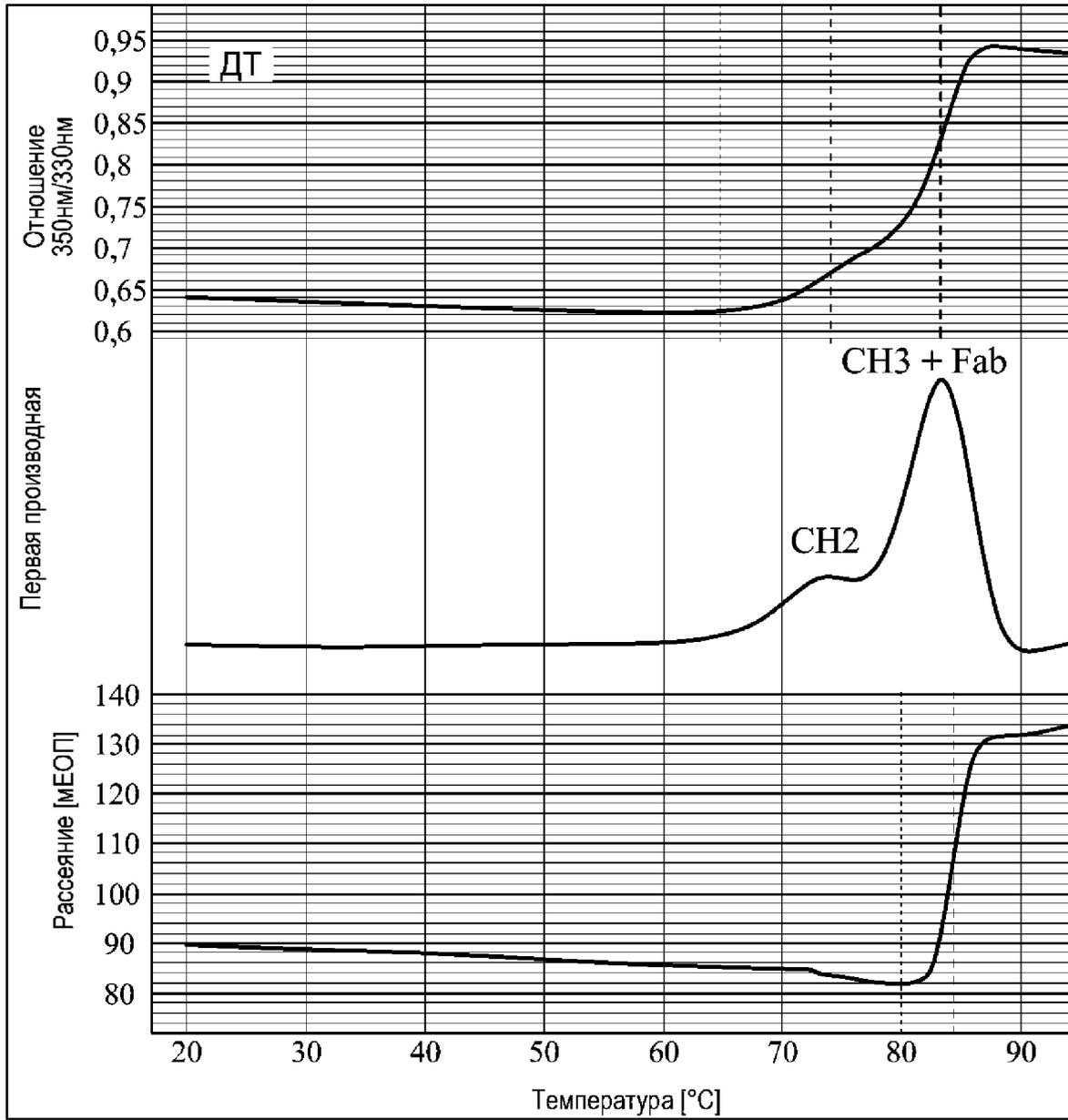
Фиг. 4В

Очистка	Теор. ср. макс. выход (мкг)	Ср. выход (мкг)	Ср. извлечение	Ср. конц. 2-го элюирования (мг/мл)
Без 2FF 1	286	98	34%	0,61
Без 2FF 2	286	117	41%	0,68
+2FF 1	230	92	40%	0,54
+2FF 2	230	96	42%	0,55

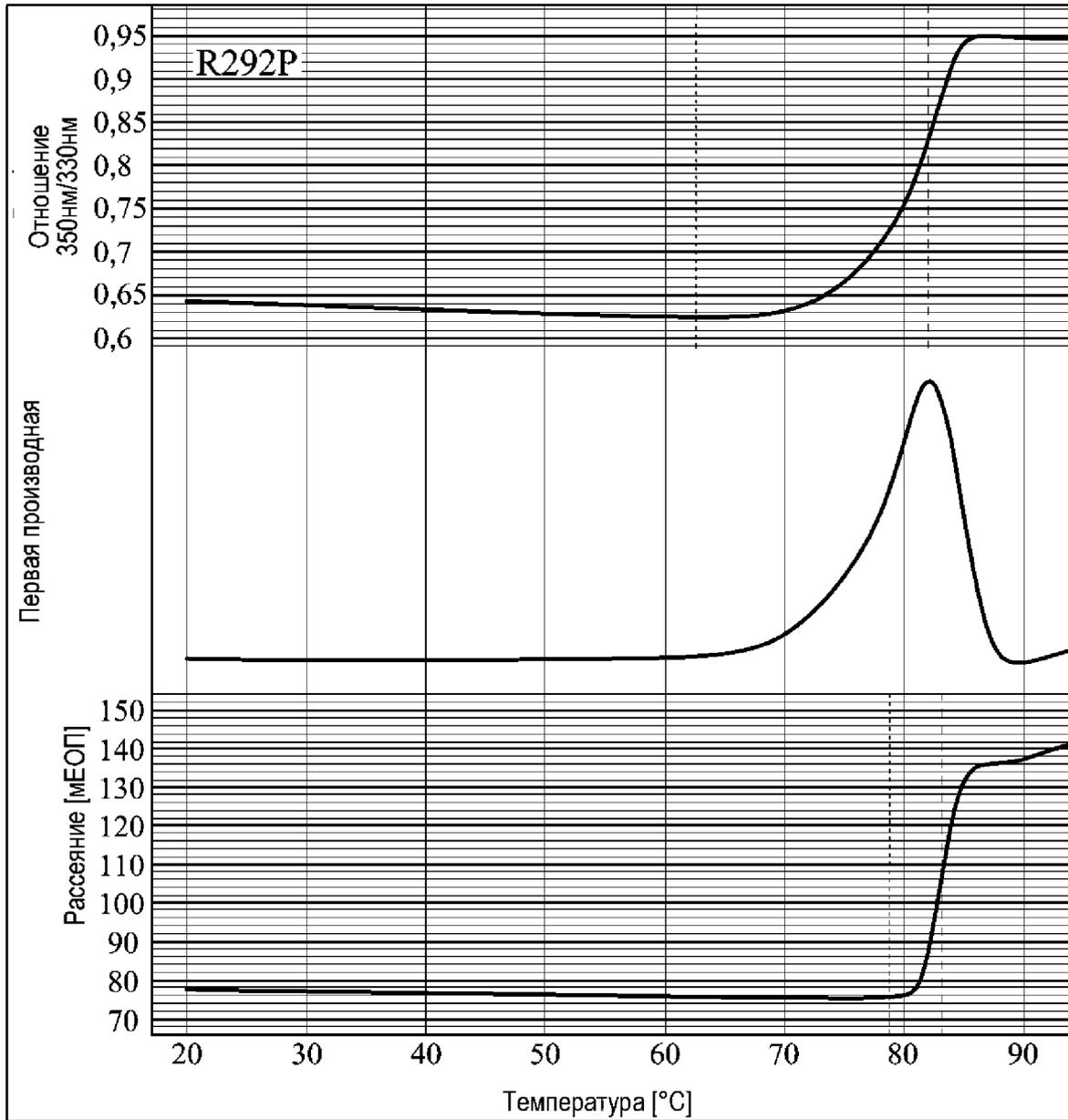
Фиг. 4С



Фиг. 5



Фиг. 6А



Фиг. 6В

Название варианта Fc (без 2FF)	FcgRIIA-H (высокоаффинный)	FcgRIIA-R (низкоаффинный)	FcgRIIB
Кратность изменений с Fc ДТ			
ДТ	1,000	1,000	1,000
R292P	0,577	0,454	0,541
Y300L	1,860	0,822	1,176
A431G	1,761	1,377	1,499
C220P	1,167	1,037	1,210
G446E	1,114	1,047	1,168
G236A	12,090	6,310	1,053
G236S	9,143	2,635	1,099
G236W	1,061	0,469	0,652
G236L	0,435	1,416	0,395
G236Y	0,735	0,418	0,547
R292P_Y300L	1,399	0,682	0,900
G236A_R292P	5,647	1,037	0,446
G236A_Y300L	18,188	4,606	1,054
R292P_G446E	0,628	0,450	0,562
G236A_R292P_Y300L	14,186	2,708	0,940
G236A_R292P_G446E	4,544	0,986	0,512
G236A_R292P_I377N	7,833	1,345	0,549
G236S_R292P_Y300L	10,853	1,341	0,817
G236A_R292P_A431G	5,212	0,939	0,511

Фиг. 7А

Название варианта Fc (без 2FF)	FcgRIIIA-H (высокоаффинный)	FcgRIIIA-R (низкоаффинный)	FcRn PH 6
Кратность изменений с Fc ДТ			
ДТ	1,000	1,000	1,000
R292P	0,917	0,790	0,898
Y300L	1,620	1,245	1,060
A431G	1,611	1,231	0,916
C220P	1,326	0,990	0,991
G446E	1,422	1,103	1,056
G236A	0,638	0,776	0,977
G236S	0,179	0,466	0,991
G236W	0,117	0,541	1,088
G236L	0,083	0,345	0,949
G236Y	0,116	0,559	1,051
R292P_Y300L	4,848	5,286	0,879
G236A_R292P	0,411	0,603	0,809
G236A_Y300L	0,871	0,997	0,981
R292P_G446E	0,916	0,779	0,884
G236A_R292P_Y300L	2,685	3,714	0,828
G236A_R292P_G446E	0,415	0,552	0,851
G236A_R292P_I377N	1,024	1,107	0,879
G236A_R292P_Y300L	0,753	1,059	0,870
G236A_R292P_A431G	0,394	0,569	0,674

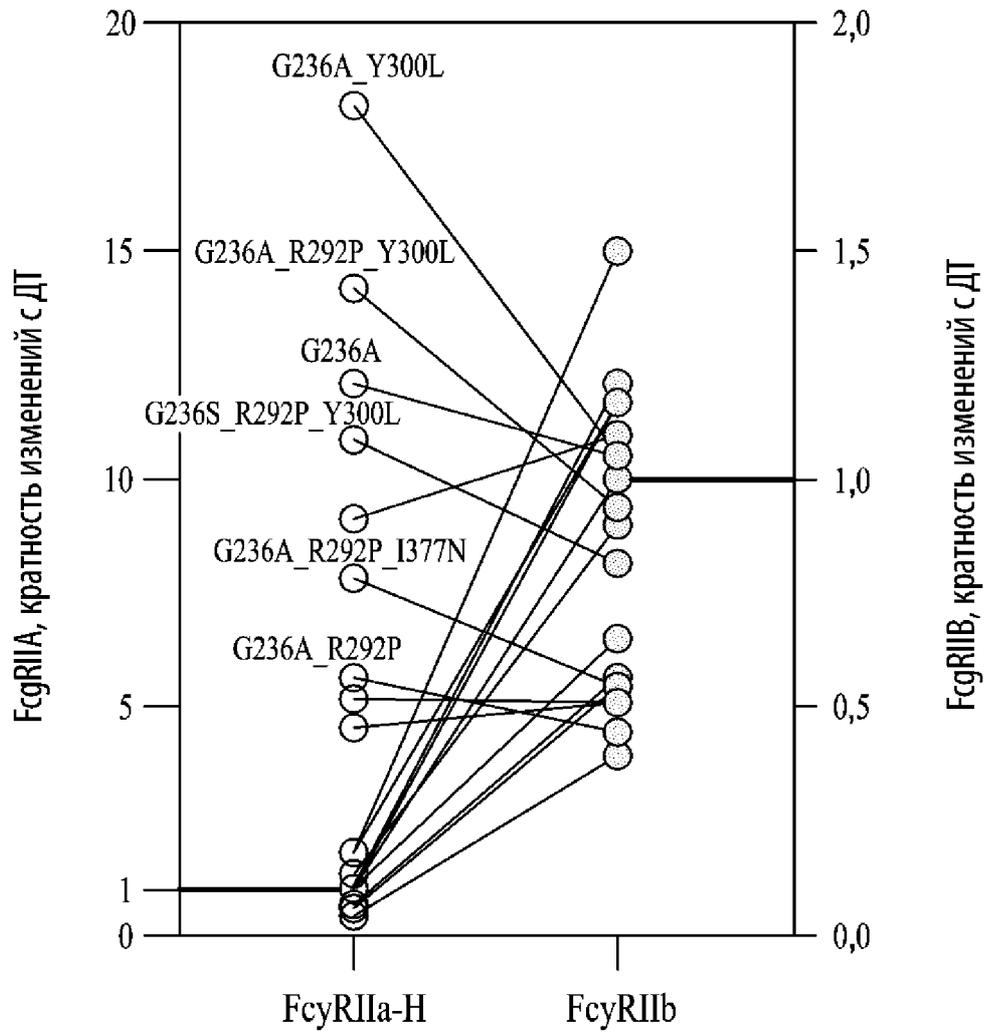
Фиг. 7А (продолж.)

Название варианта Fc (без 2FF)	FcgRIIA-H (высокоаффинный)	FcgRIIB	Отношение IIA/IIB	FcgRIIA-V (высокоаффинный)
Кратность изменений с Fc ДТ				
ДТ	1,000	1,000	1,000	1,000
R292P	0,577	0,541	1,067	0,917
Y300L	1,860	1,176	1,582	1,620
A431G	1,761	1,499	1,175	1,611
C220P	1,167	1,210	0,964	1,326
G446E	1,114	1,168	0,954	1,422
G236A	12,090	1,053	11,483	0,638
G236S	9,143	1,099	8,317	0,179
G236W	1,061	0,652	1,628	0,117
G236L	0,435	0,395	1,102	0,083
G236Y	0,735	0,547	1,345	0,116
R292P_Y300L	1,399	0,900	1,554	4,848
G236A_R292P	5,647	0,446	12,658	0,411
G236A_Y300L	18,188	1,054	17,260	0,871
R292P_G446E	0,628	0,562	1,117	0,916
G236A_R292P_Y300L	14,186	0,940	15,098	2,685
G236A_R292P_G446E	4,544	0,512	8,881	0,415
G236A_R292P_I377N	7,833	0,549	14,268	1,024
G236S_R292P_Y300L	10,853	0,817	13,283	0,753
G236A_R292P_A431G	5,212	0,511	10,191	0,394
GAALIE (AVG2, 1й планшет)	3,605	0,605	5,955	2,039
GAALIE-LS (1й планшет)	2,888	0,422	6,848	1,563

Фиг. 7В

Название варианта Fc (без 2FF)	FcRn PH 6	Связывание C1q	CDC
Кратность изменений с Fc ДТ			
ДТ	1,000	1,000	1,000
R292P	0,898	0,549	0,656
Y300L	1,060	2,157	0,887
A431G	0,916	0,824	н.д.
C220P	0,991	0,761	н.д.
G446E	1,056	0,840	н.д.
G236A	0,977	0,358	0,488
G236S	0,991	0,391	н.д.
G236W	1,088	3,662	1,035
G236L	0,949	1,480	н.д.
G236Y	1,051	3,252	1,065
R292P_Y300L	0,879	2,088	1,254
G236A_R292P	0,809	0,125	0,613
G236A_Y300L	0,981	0,981	н.д.
R292P_G446E	0,884	0,391	н.д.
G236A_R292P_Y300L	0,828	1,012	0,935
G236A_R292P_G446E	0,851	0,099	0,522
G236A_R292P_I377N	0,879	0,235	0,809
G236S_R292P_Y300L	0,870	1,976	0,936
G236A_R292P_A431G	0,674	0,100	0,581
GAALIE (AVG2, 1й планшет)	0,937	-0,004	0,364
GAALIE-LS (1й планшет)	12,327	FLGEPLSE (1й)	1,463

Фиг. 7В (продолж.)



Фиг. 8

	IIA-H	IIB	Отношение
ДТ	1,00	1,00	1,00
GAALIE (1й)	2,20	1,58	1,39
R292P	0,63	0,13	4,89
Y300L	1,33	1,05	1,27
G236A	2,52	1,27	1,99
G236W	1,53	0,24	6,40
G236Y	1,02	0,05	22,21
R292P_Y300L	1,36	0,96	1,41
G236A_R292P	2,06	0,18	11,28
G236A_R292P_Y300L	2,45	1,30	1,88
G236A_R292P_G446E	1,95	0,09	21,63
G236A_R292P_I377N	1,96	0,28	6,94
G236A_R292P_Y300L	2,02	0,75	2,70
G236A_R292P_A431G	1,87	0,16	11,38
A431G	1,20	1,38	0,87
C220P	1,65	1,75	0,94
G446E	1,48	1,16	1,28
G236S	2,23	1,27	1,75
G236L	0,25	0,02	11,67
G236A_Y300L	2,52	1,65	1,53
R292P_G446E	0,81	0,12	6,57
	Фукозили- рованный	Фукозили- рованный	Фукозили- рованный

Фиг. 9А

	IIIА-V		IIIА-F	
ДТ	1,00	5,20	1,00	16,45
GAALIE (1й)	3,54	6,44	13,92	29,86
R292P	0,98	3,24	0,46	5,10
Y300L	1,12	4,61	1,40	12,02
G236A	0,58	4,14	0,34	9,81
G236W	0,02	2,09	0,07	6,60
G236Y	0,02	1,34	0,07	4,07
R292P_Y300L	3,80	4,90	8,29	13,76
G236A_R292P	0,56	2,92	0,33	6,72
G236A_R292P_Y300L	3,00	4,06	7,16	11,37
G236A_R292P_G446E	0,51	2,76	0,36	4,12
G236A_R292P_I377N	0,99	3,56	0,93	6,44
G236A_R292P_Y300L	1,18	2,58	1,01	4,35
G236A_R292P_A431G	0,47	2,14	0,12	2,89
A431G	1,20	5,61		
C220P	1,18	4,77	Фукозили- рованный	Афукозили- рованный
G446E	1,21	4,63		
G236S	0,13	3,36		
G236L	0,02	0,03		
G236A_Y300L	0,87	4,10		
R292P_G446E	1,22	3,53		
	Фукозили- рованный	Афукозили- рованный		

Фиг. 9В

Варианты	IIA_H	IIA_R	IIB	IIA-H/IIB	IIA-R/IIB	IIIA_V	IIIA_F	IIIB
Высокое IIA/IIB, низкое IIB				Расчетное	Расчетное			
G236A	8,50	5,53	0,81	10,49	6,83	0,49	0,69	0,82
G236A_L328V_Q295E	7,80	10,78	0,86	9,07	12,53	0,36	0,52	0,70
G236A_P230A_Q295E	7,67	4,57	0,54	14,20	8,46	0,31	0,48	0,72
G236A_R292P_I377N	7,83	1,34	0,55	14,24	2,44	1,02	1,11	0,96
G236A_K334A_Q295E	4,96	2,92	0,67	7,40	4,36	0,27	0,74	0,72
G236S_R292P_Y300L	10,85	1,34	0,82	13,23	1,63	0,75	1,06	1,04
Сильное увеличение IIA, IIB без изменений								
G236S	9,14	2,63	1,10	8,31	2,39	0,18	0,47	0,92
G236A_Y300L	18,19	4,61	1,05	17,32	4,39	0,87	1,00	0,97
Сильное уменьшение IIB								
G236S_G420V_G446E_L309T	4,85	1,47	0,39	12,44	3,77	0,09	0,32	0,56
G236A_R292P	5,65	1,04	0,45	12,56	2,31	0,41	0,60	0,95
Высокое IIA/IIB, низкое IIB, увеличение IIIA								
G236A_A330L_I332E	3,54	1,39	0,61	5,80	2,28	2,01	12,25	1,78
G236A_A330L_I332E_M428L_N434S	2,89	1,27	0,42	6,88	3,02	1,56	9,41	1,40

Фиг. 10А - 1

ФИГ.10А-1	ФИГ.10А-3
ФИГ.10А-2	ФИГ.10А-4

Фиг. 10А

Варианты	IIA_H	IIA_R	IIB	IIA-H/IIB	IIA-R/IIB	IIIA_V	IIIA_F	IIIB
				Расчетное	Расчетное			
Высокое IIA, IIB без значительных изменений, увеличение IIIA, имеет C1q								
G236A_R292P_Y300L	14,19	2,71	0,94	15,10	2,88	2,69	3,71	1,03
Значительное увеличение IIIA, Tm большей частью снижается								
R292P_Y300L	1,40	0,68	0,90	1,56	0,76	4,85	5,29	1,72
A330L_I332E	0,42	0,52	0,66	0,64	0,79	3,52	11,90	5,19
G236A_S239D_A330L_I332E	5,15	9,68	1,94	2,65	4,99	8,03	55,13	13,99
Подавление связывания FcgR (такое же, как фоновое)								
G236R_L328R	0,14	0,22	0,16	0,88	1,38	0,05	0,26	0,61
Другие контроли								
L309T_P238D_P396L_T366A	0,17	0,50	3,08	0,06	0,16	0,05	0,26	0,58
S239D_H268E_G236A	11,72	53,52	5,09	2,30	10,51	7,90	16,33	3,04
R292P	0,58	0,45	0,54	0,92	0,83	0,79	0,93	0,9
Y300L	1,86	0,82	1,18	1,62	0,69	1,24	1,01	1,06

Фиг. 10А - 2

Варианты	FcRn	C1q	Tm	Tитр	Сигнализация_IIA_H	Сигнализация_IIB	Сигнализация_IIIA_V	Сигнализация_IIIA_F
Высокое IIA/IIB, низкое IIB								
G236A	0,99	0,06	-1,30	-0,06	2,51	1,06	0,65	0,46
G236A_L328V_Q295E	1,08	0,07	-11,26	0,01	2,18	0,66	0,03	0,02
G236A_P230A_Q295E	0,93	0,30	-6,19	0,02	2,29	0,56	0,06	0,02
G236A_R292P_I377N	0,88	0,24	-1,08	-0,03	2,15	0,35	0,11	1,40
G236A_K334A_Q295E	1,02	0,90	-8,06	0,02	2,13	0,80	0,36	0,23
G236S_R292P_Y300L	0,87	1,98	-4,00	-0,01	2,24	0,93	1,32	1,52
Сильное увеличение IIA, IIB без изменений								
G236S	0,99	0,39	-2,36	0,00	1,95	1,37	0,11	Нечисловое значение
G236A_Y300L	0,98	0,98	-4,45	-0,04	2,21	1,78	0,74	Нечисловое значение
Сильное уменьшение IIB								
G236S_G420V_G446E_L309T	0,77	0,21	1,89	-0,01	2,56	0,22	0,06	0,03
G236A_R292P	0,81	0,13	-4,00	-0,08	1,47	0,15	0,54	0,29
Высокое IIA/IIB, низкое IIB, увеличение IIIA								
G236A_A330L_I332E	0,94	0,00	-13,51	-0,01	1,98	0,55	3,24	9,57
G236A_A330L_I332E_M428L_N434S	12,33	0,00	-14,26	0,00	2,32	0,35	3,92	13,51

Фиг. 10А - 3

Варианты	FcRn	C1q	Tm	Титр	Сигнализация_IIA_H	Сигнализация_IIB	Сигнализация_IIIA_V	Сигнализация_IIIA_F
Высокое IIA, IIB без значительных изменений, увеличение IIIA, имеет C1q								
G236A_R292P_Y300L	0,83	1,01	-4,00	-0,02	1,87	1,01	2,83	6,15
Значительное увеличение IIIA, Tm большей частью снижается								
R292P_Y300L	0,88	2,09	-4,00	-0,04	0,98	0,72	3,66	7,42
A330L_I332E	1,12	0,03	-12,98	-0,02	0,71	0,69	4,38	11,91
G236A_S239D_A330L_I332E	1,02	0,00	-23,37	-0,04	2,47	1,20	6,02	19,43
Подавление связывания FcγR (такое же, как фоновое)								
G236R_L328R	1,03	Нечисловое значение	-3,73	0,03	0,05	0,04	0,02	0,27
Другие контроли								
L309T_P238D_P396L_T366A	0,88	0,01	-13,37	-0,01	0,04	0,91	0,01	0,05
S239D_H268E_G236A	0,91	0,40	-8,34	0,00	2,15	1,80	5,22	12,85
R292P	0,55	0,55	-0,01	0,71	0,16	0,69		1,13
Y300L	2,16	2,16	0,02	1,52	1,3	2,1		1,27

Фиг. 10А - 4

Варианты (кратность к фукозе ДТ)	IIA_H	IIA_R	IIB	IIIA-V	IIIA-F	IIIB	FcRn	C1q
Высокое IIA/IIB, низкое IIB								
G236A-afuc	7,59	7,91	0,91	10,20	25,67	1,92	0,95	Нечисловое значение
G236A_L328V_Q295E-afuc	7,54	10,07	1,13	8,41	12,71	2,31	1,09	Нечисловое значение
G236A_P230A_Q295E-afuc	8,94	6,04	0,67	10,84	26,73	1,80	1,02	Нечисловое значение
G236A_R292P_I377N-afuc	5,54	1,35	0,60	7,14	14,79	1,20	0,80	Нечисловое значение
G236A_K334A_Q295E-afuc	5,32	3,75	0,55	7,93	27,49	1,62	1,11	Нечисловое значение
G236S_R292P_Y300L-afuc	8,13	1,50	0,72	3,17	5,47	1,04	0,80	Нечисловое значение
Сильное увеличение IIA, IIB без изменений								
G236S-afuc	7,37	4,39	1,08	4,63	10,60	1,37	0,85	Нечисловое значение
G236A_Y300L-afuc	14,86	3,95	0,93	13,73	30,09	2,55	0,92	Нечисловое значение
Сильное уменьшение IIB								
G236S_G420V_G446E_L309T-afuc	3,62	1,70	0,44	1,99	3,35	0,86	0,77	Нечисловое значение
G236A_R292P-afuc	3,05	1,04	0,51	3,37	5,83	1,15	0,73	Нечисловое значение
Высокое IIA/IIB, низкое IIB, увеличение IIIA								
G236A_A330L_I332E-afuc	3,45	1,65	0,67	31,96	259,43	14,14	1,09	Нечисловое значение
G236A_A330L_I332E_M428L_N434S-afuc	2,56	1,20	0,41	34,46	275,26	11,77	7,37	Нечисловое значение

Фиг. 10В - 1

Фиг.10В-1	Фиг.10В-3
Фиг.10В-2	Фиг.10В-4

Фиг. 10В

Варианты (кратность к фукозе ДТ)	IIA_H	IIA_R	IIB	IIIA-V	IIIA-F	IIIB	FcRn	C1q
Высокое IIA, IIB без значительных изменений, увеличение IIIA, имеет C1q								
G236A_R292P_Y300L-afuc	11,22	2,22	1,03	9,13	19,74	1,83	0,80	Нечисловое значение
Значительное увеличение IIIA, Tm большей частью снижается								
R292P_Y300L-afuc	1,27	0,72	1,05	16,14	26,54	4,53	0,82	Нечисловое значение
A330L_I332E-afuc	0,42	0,53	0,61	37,80	191,41	37,41	1,00	Нечисловое значение
G236A_S239D_A330L_I332E-afuc	3,58	7,58	1,21	75,61	729,90	94,34	0,96	Нечисловое значение
Подавление связывания FcγR (такое же, как фоновое)								
G236R_L328R-afuc	0,16	0,24	0,17	0,07	0,33	0,60	1,09	Нечисловое значение
Другие контроли								
L309T_P238D_P396L_T366A-afuc	0,18	0,34	1,71	0,09	0,49	0,64	0,95	Нечисловое значение
S239D_H268E_G236A-afuc	13,60	61,96	6,35	84,91	424,82	38,06	1,01	Нечисловое значение

Фиг. 10В - 2

Варианты (кратность к фукозе ДТ)	Tm	Титр	Сигнализация_IIA_H	Сигнализация_IIB	Сигнализация_IIIA_V	Сигнализация_IIIA_F
Высокое IIA/IIB, низкое IIB						
G236A-afuc	-0,15	-0,01	Нечисловое значение	Нечисловое значение	5,01	13,36
G236A_L328V_Q295E-afuc	-10,82	-0,04	Нечисловое значение	Нечисловое значение	5,31	6,79
G236A_P230A_Q295E-afuc	-5,84	0,02	Нечисловое значение	Нечисловое значение	5,54	10,95
G236A_R292P_I377N-afuc	1,64	-0,04	Нечисловое значение	Нечисловое значение	3,94	9,68
G236A_K334A_Q295E-afuc	-7,73	0,03	Нечисловое значение	Нечисловое значение	5,54	12,73
G236S_R292P_Y300L-afuc	Нечисловое значение	-0,03	Нечисловое значение	Нечисловое значение	2,87	6,54
Сильное увеличение IIA, IIB без изменений						
G236S-afuc	-0,26	0,02	Нечисловое значение	Нечисловое значение	2,86	Нечисловое значение
G236A_Y300L-afuc	-2,92	-0,04	Нечисловое значение	Нечисловое значение	3,49	Нечисловое значение
Сильное уменьшение IIB						
G236S_G420V_G446E_L309T-afuc	3,12	0,02	Нечисловое значение	Нечисловое значение	4,00	4,41
G236A_R292P-afuc	Нечисловое значение	-0,04	Нечисловое значение	Нечисловое значение	2,18	3,34
Высокое IIA/IIB, низкое IIB, увеличение IIIA						
G236A_A330L_I332E-afuc	-13,03	-0,01	Нечисловое значение	Нечисловое значение	5,27	14,81
G236A_A330L_I332E_M428L_N434S-afuc	-13,95	0,01	Нечисловое значение	Нечисловое значение	6,20	16,38

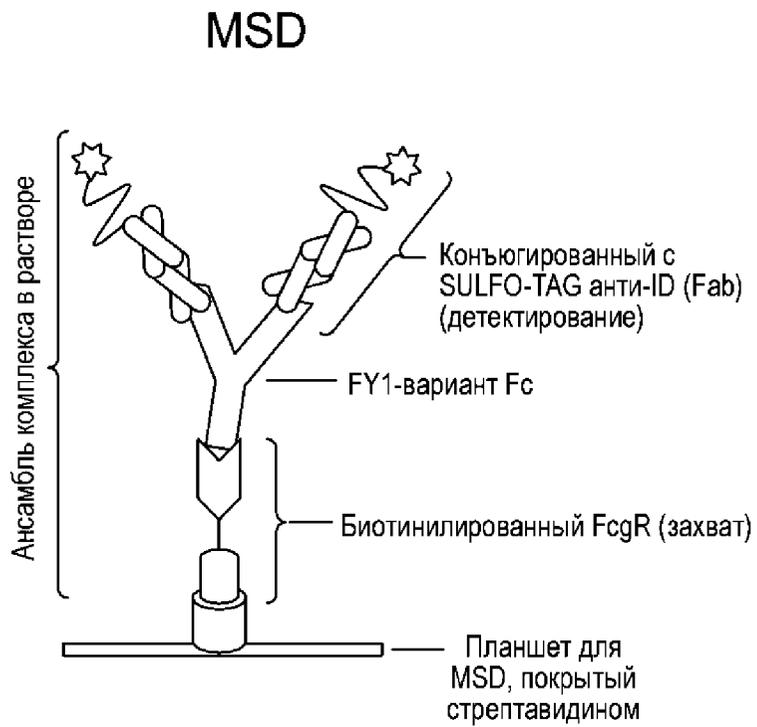
Фиг. 10В - 3

Варианты (кратность к фукозе ДТ)	Tm	Титр	Сигнализация_IIA_H	Сигнализация_IIB	Сигнализация_IIIA_V	Сигнализация_IIIA_F
Высокое IIA, IIB без значительных изменений, увеличение IIIA, имеет C1q						
G236A_R292P_Y300L-afuc	Нечисловое значение	-0,07	Нечисловое значение	Нечисловое значение	3,85	9,46
Значительное увеличение IIIA, Tm большей частью снижается						
R292P_Y300L-afuc	Нечисловое значение	-0,03	Нечисловое значение	Нечисловое значение	4,52	10,64
A330L_I332E-afuc	-12,76	0,02	Нечисловое значение	Нечисловое значение	6,34	16,91
G236A_S239D_A330L_I332E-afuc	-22,70	-0,02	Нечисловое значение	Нечисловое значение	5,16	11,51
Подавление связывания FcgR (такое же, как фоновое)						
G236R_L328R-afuc	-3,57	0,03	Нечисловое значение	Нечисловое значение	0,20	0,05
Другие контроли						
L309T_P238D_P396L_T366A-afuc	-13,57	0,01	Нечисловое значение	Нечисловое значение	0,16	0,04
S239D_H268E_G236A-afuc	-7,94	-0,02	Нечисловое значение	Нечисловое значение	5,65	11,64

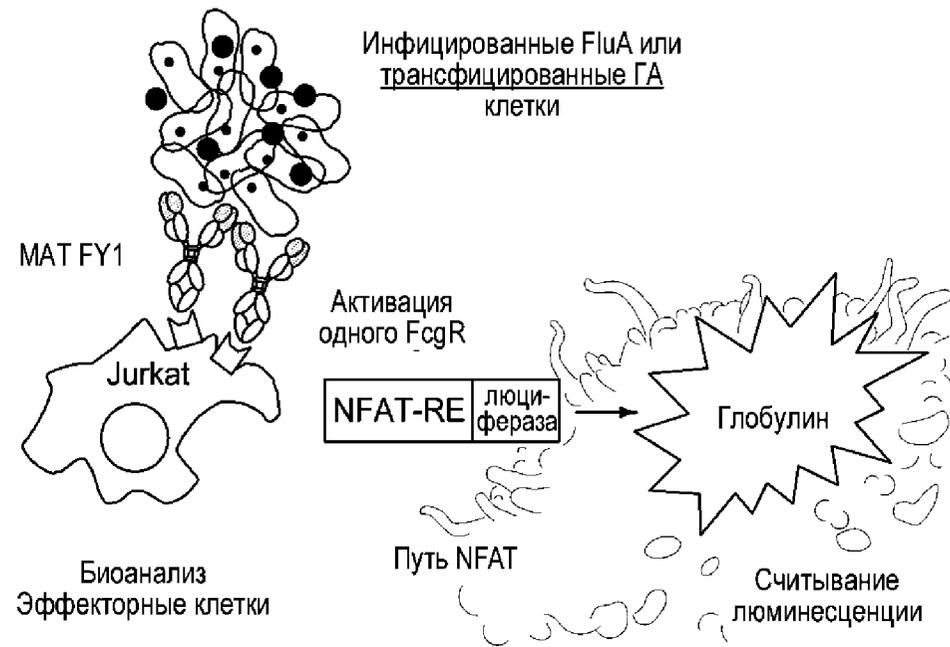
Фиг. 10В - 4

K3Ц & C1q	IIA_H	IIA_R	IIB	IIA/IIB	IIIA_V	IIIA_F	FcRn	C1q	Tm
G236S_R292P_Y300L	10,85	1,34	0,82	13,24	0,75	1,06	0,87	1,96	-4,00
R292P_Y300L	1,40	0,68	0,90	1,56	4,85	5,29	0,88	2,07	-4,00
Y300L	1,86	0,82	1,18	1,58	1,62	1,24	1,06	2,14	-2,96
E345K_G236S_L235Y_S267E	0,53	9,22	1,71	0,34	0,05	0,29	0,90	2,35	нечисл. знач.
E272R_L309T_S219Y_S267E	0,33	10,65	4,77	0,10	0,11	0,37	0,98	2,53	нечисл. знач.
G236Y	0,74	0,42	0,55	1,35	0,12	0,56	1,05	3,22	-3,24
G236W	1,06	0,47	0,65	1,63	0,12	0,54	1,09	3,63	-4,19
F243L_G446E_P396L_S267E	0,77	31,05	15,73	0,07	0,24	0,63	1,05	4,17	нечисл. знач.

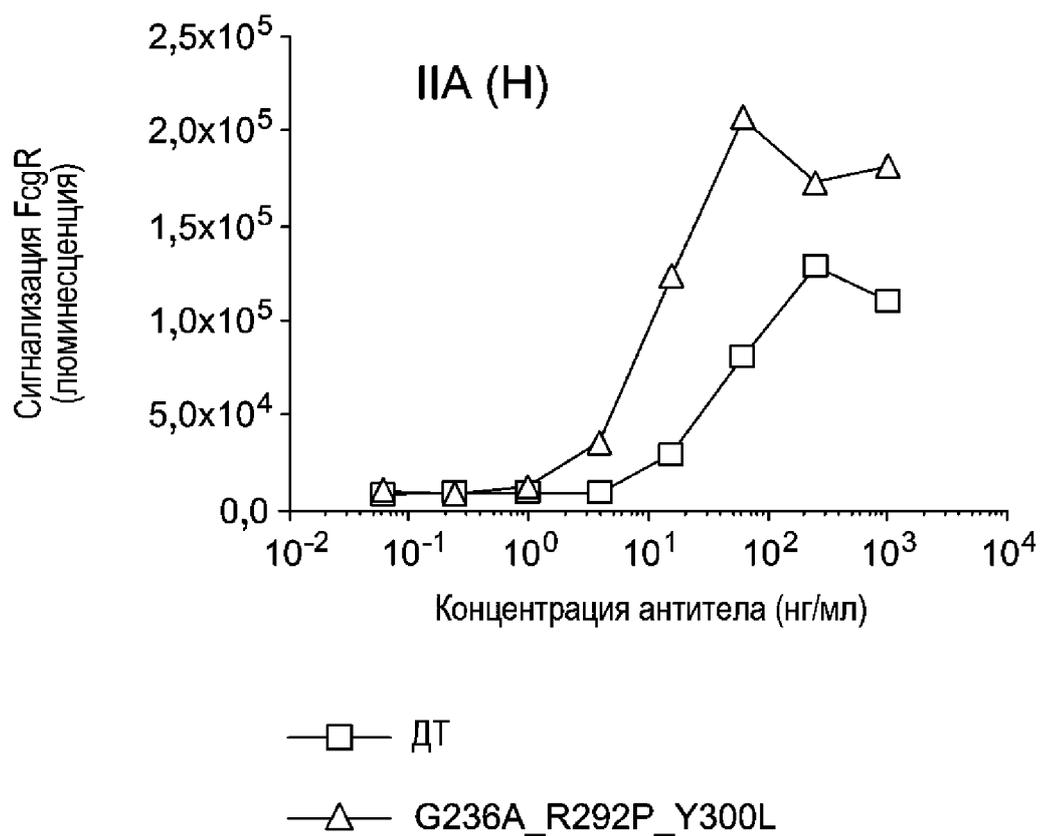
Фиг. 10С



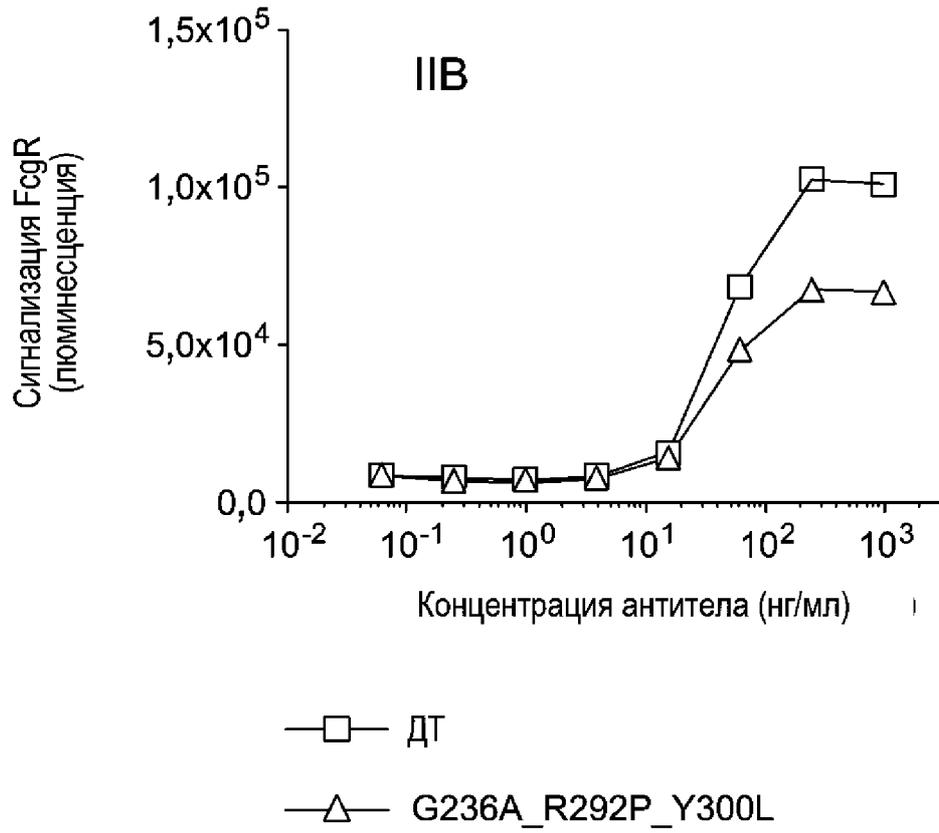
### Клеточный репортерный анализ



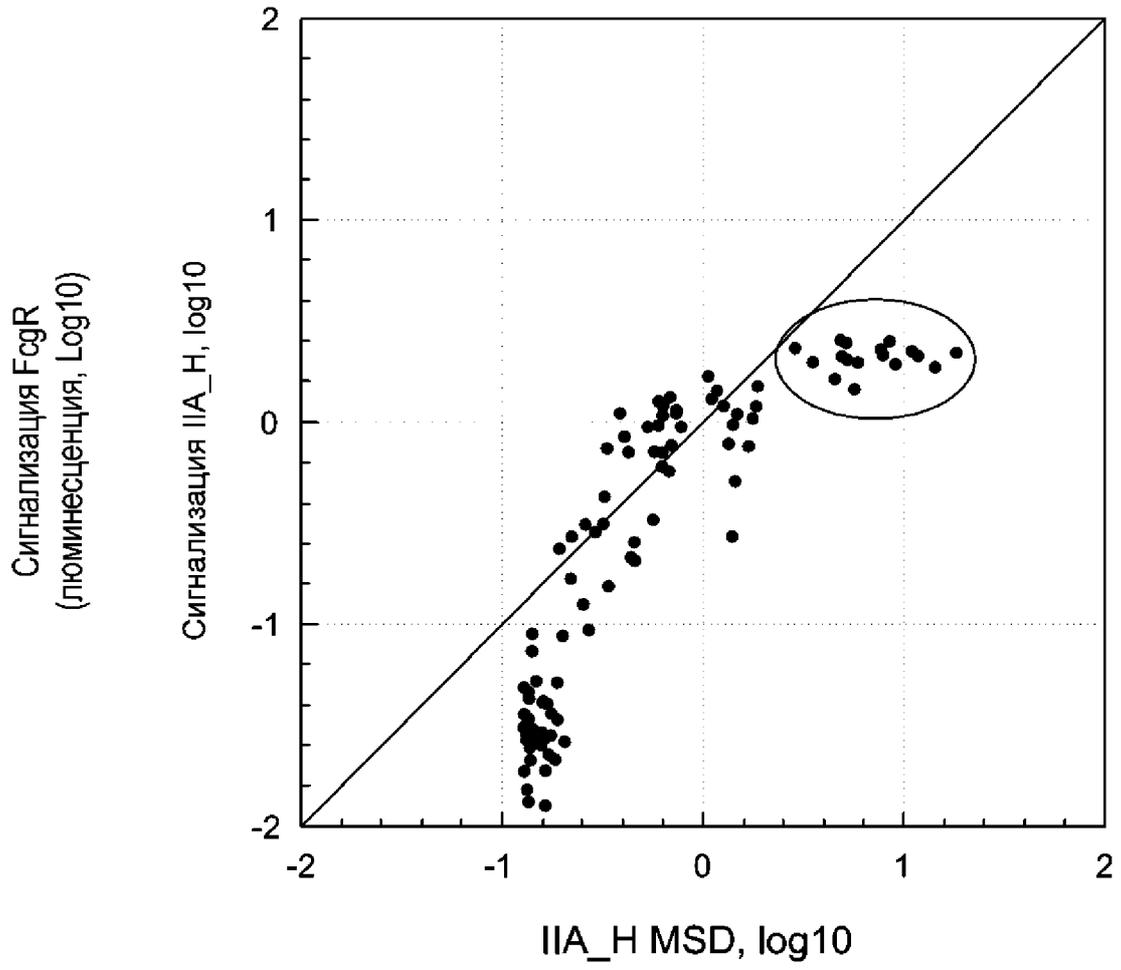
Фиг. 11



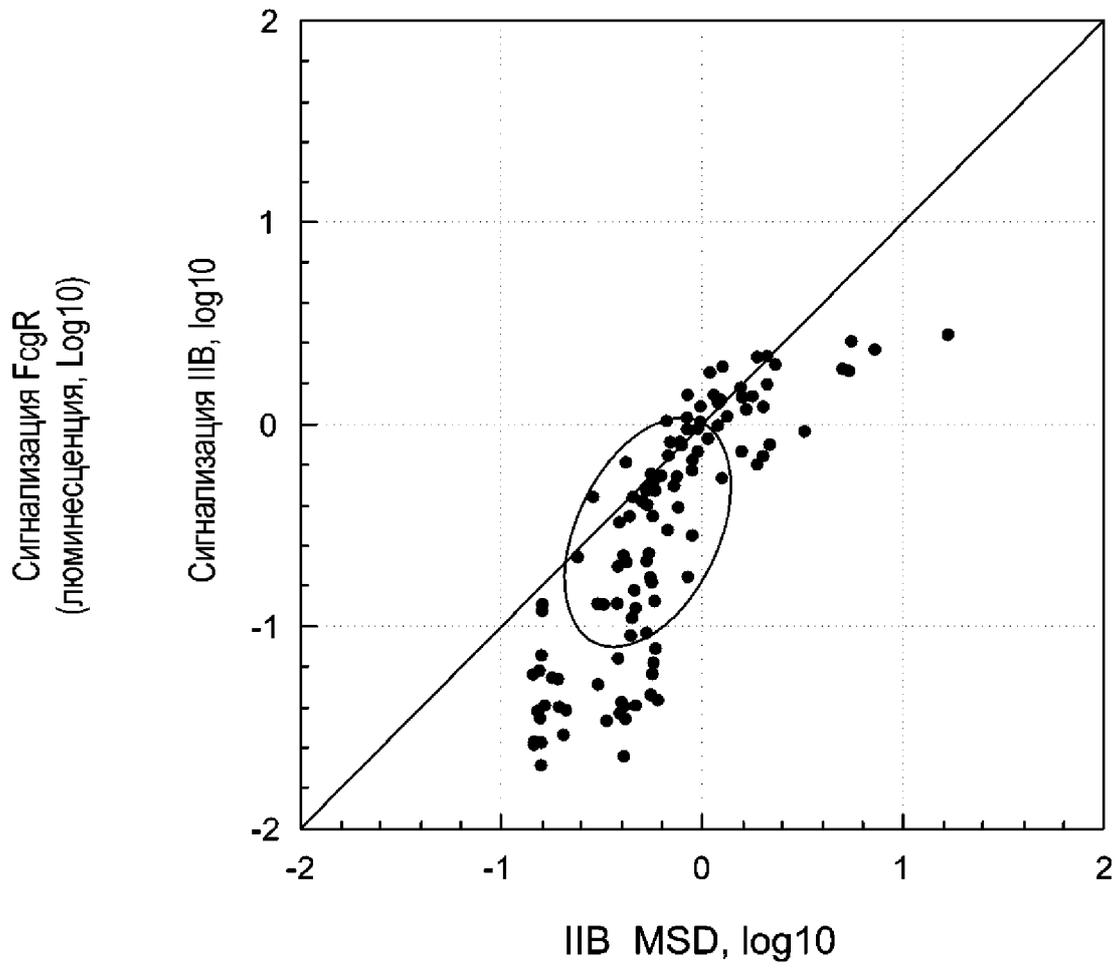
Фиг. 12А



Фиг. 12В

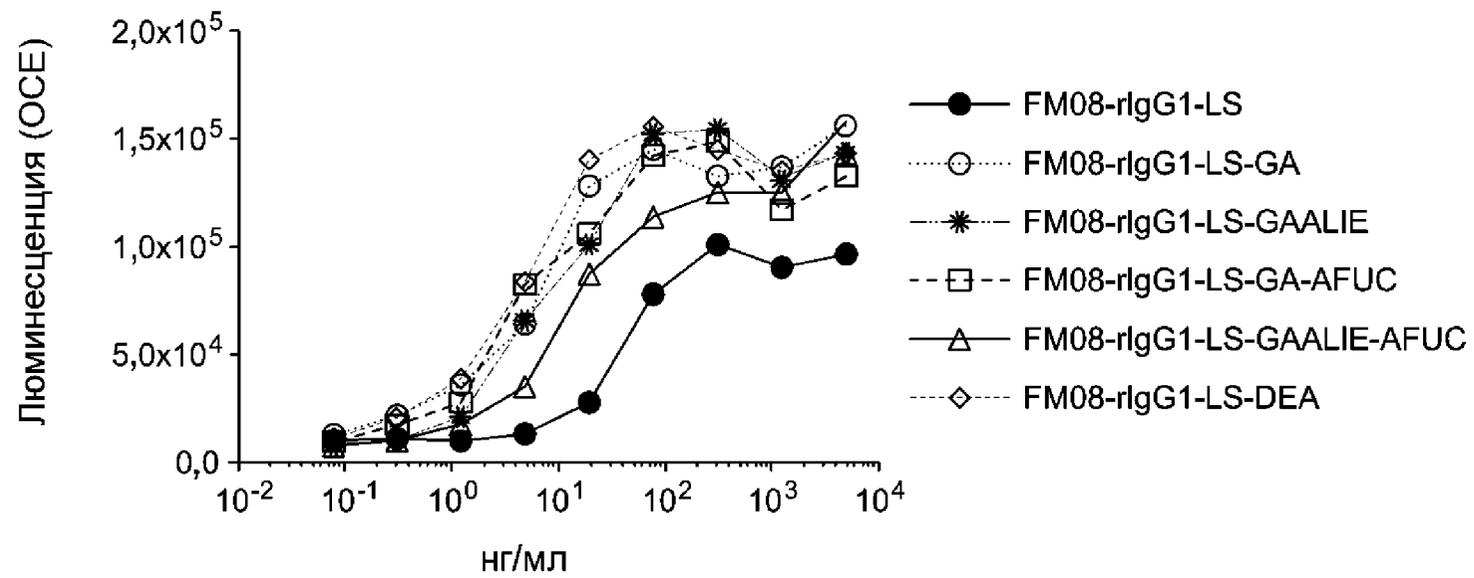


Фиг. 13А



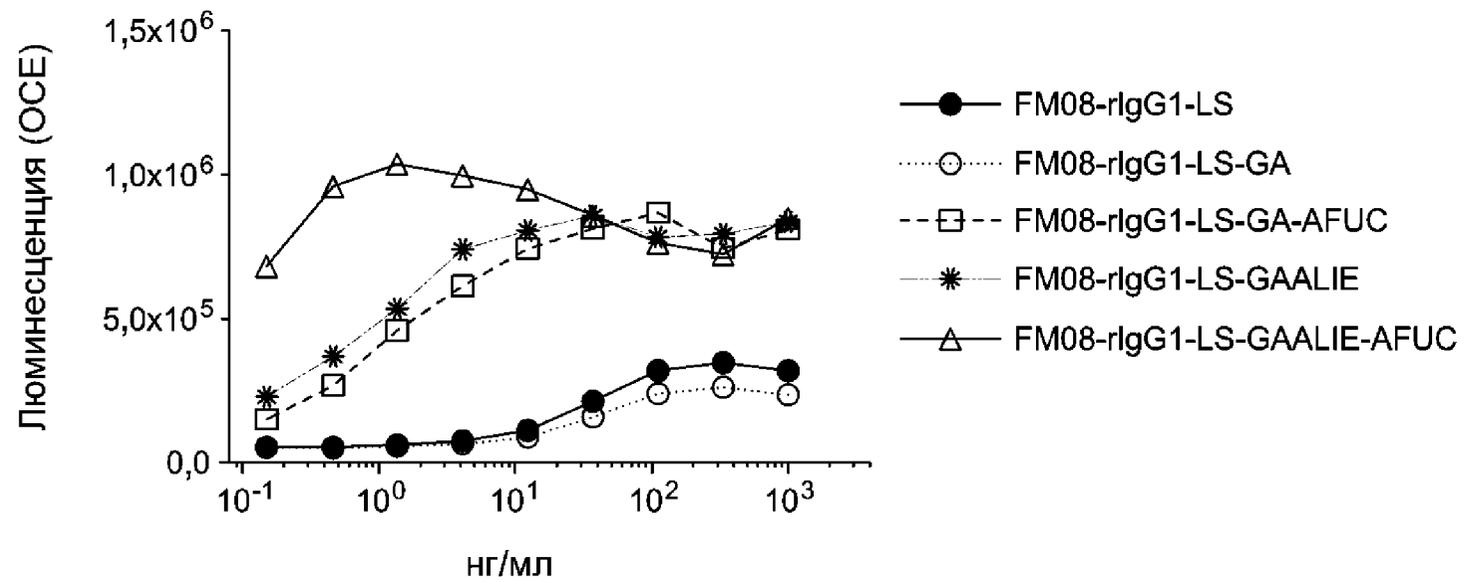
Фиг. 13В

Активация Jurcat-FcgRIIa (H131) с  
помощью A549-CA  
Люминесценция 24 ч



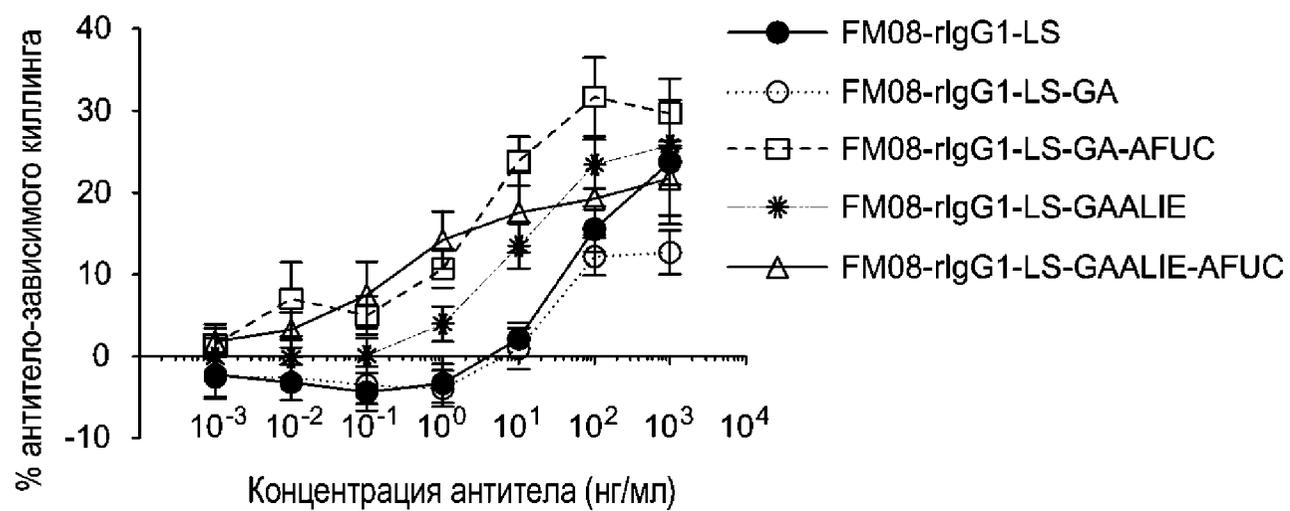
Фиг. 14А

Активация Jurkat-FcγRIIIa (F158) с  
помощью A549-CA  
Люминесценция 24 ч



Фиг. 14В

АЗКЦТ: А549-НА (СА) выделенные ЕК (НМ\_WB014\_FF),  
 отношение эффектор:мишень 6:1  
 Высвобождение ЛДГ

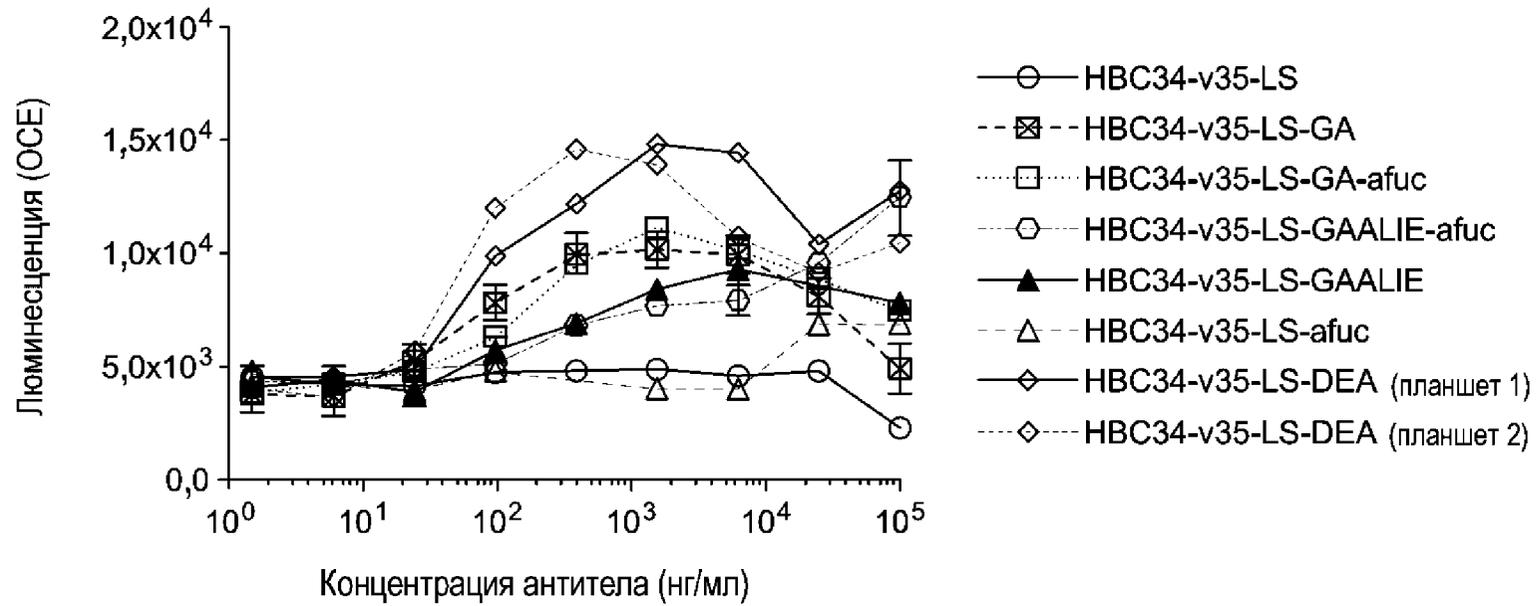


Фиг. 14С

Вариант Fc	Ответ	Кратность изменения к LS
FY1-rlgG1m3-LS	0,251	1,00
FY1-rlgG1m3-LS-G236A	0,087	0,35
FY1-rlgG1m3-LS-G236A-A330L-I332E	-0,008	-0,03
FY1-rlgG1m3-LS-A330L-I332E	-0,008	-0,03
FY1-rlgG1m3-LS-G326R-L328R	-0,008	-0,03

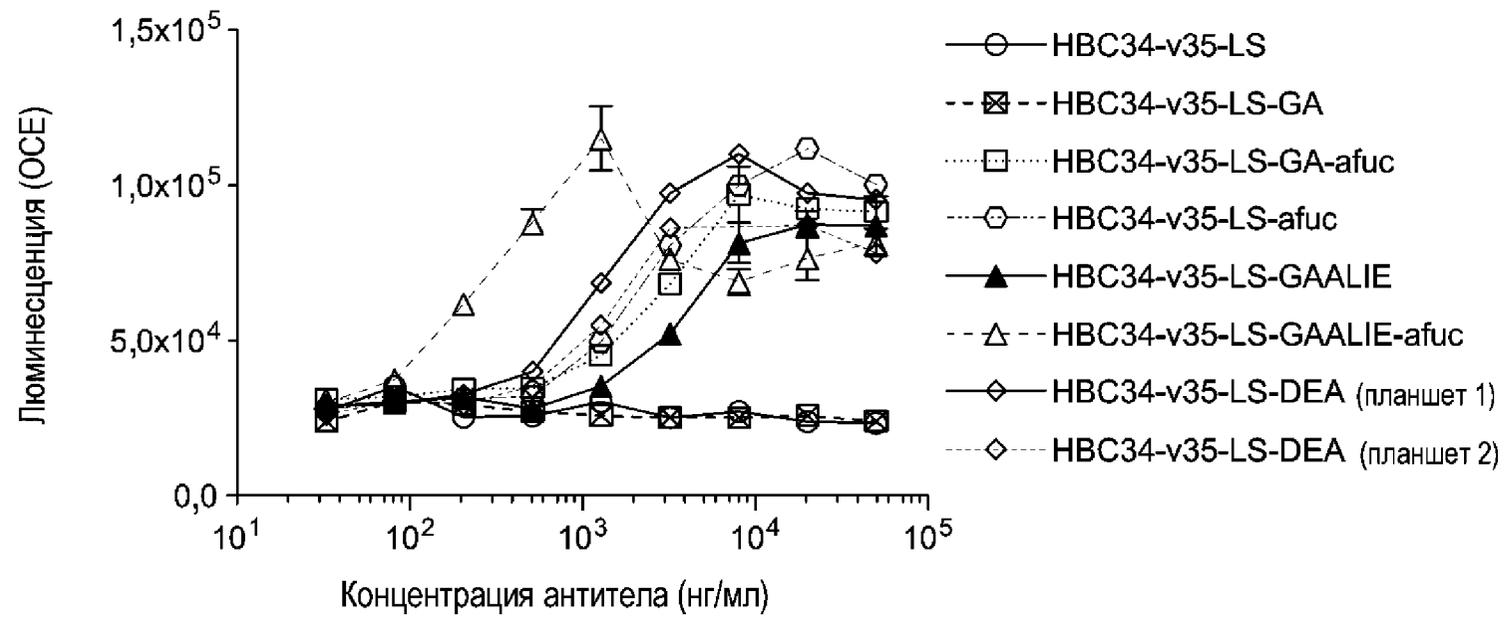
Фиг. 15

Активация Jurcat-FcγRIIa (H131) с помощью HBsAg  
 Проспек (1,14 мкг/мл - 250 Ед/мл)  
 Люминесценция 25 ч



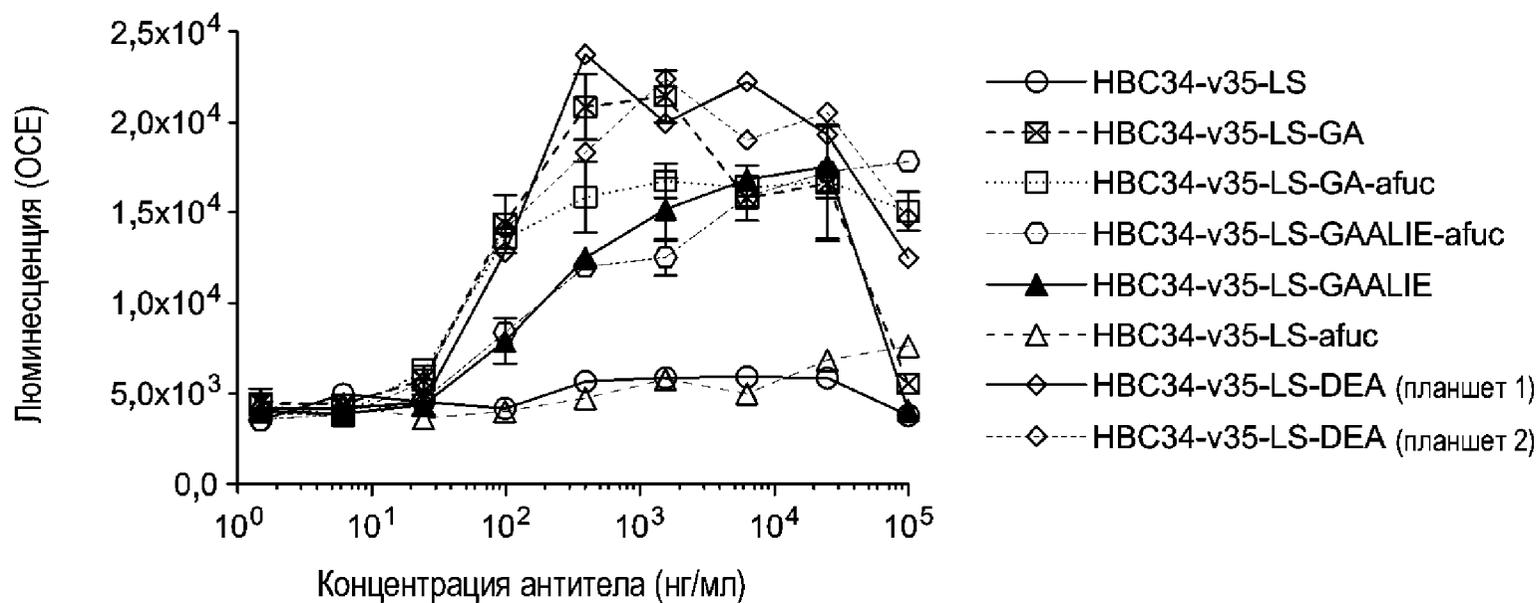
Фиг. 16А

Активация Jurcat-FcγRIIIa (F158) с помощью HBsAg  
 Проспек (22,72 мкг/мл - 5000 Ед/мл)  
 Люминесценция 22 ч



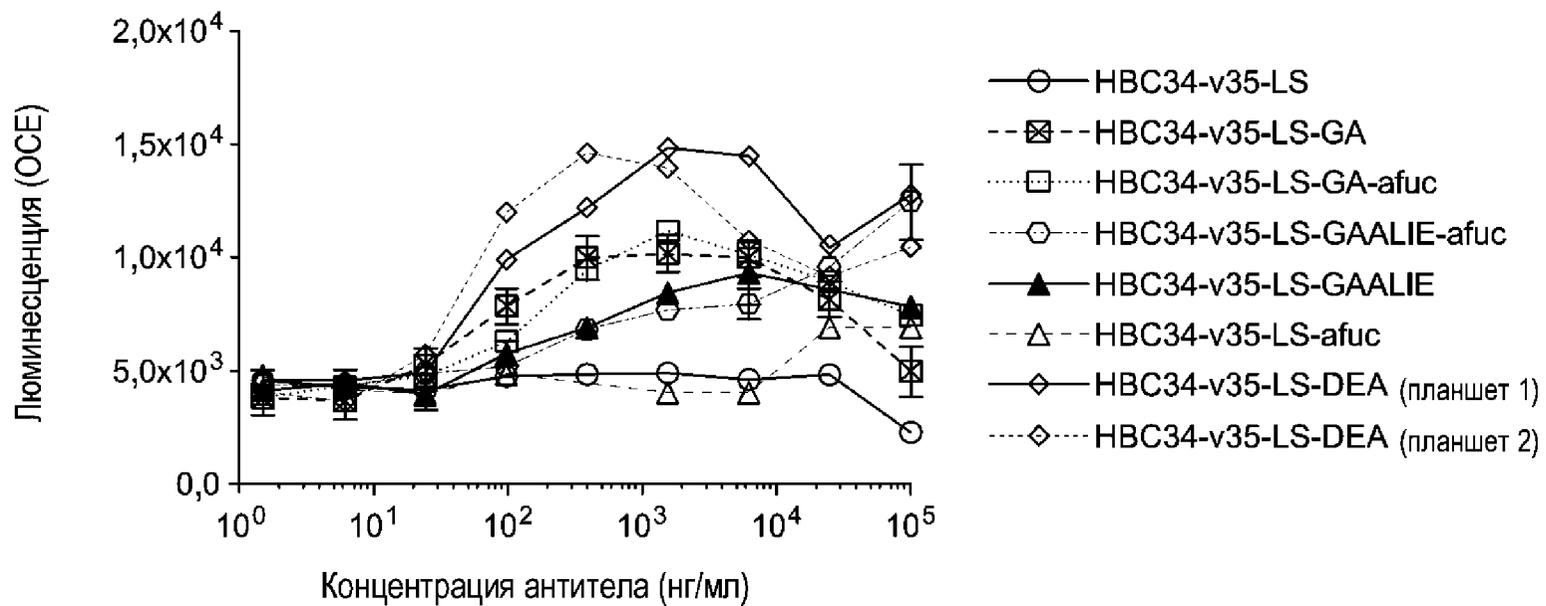
Фиг. 16В

Активация Jurcat-FcgRIIa (H131) с помощью HBsAg  
 Проспек (1,14 мкг/мл - 250 Ед/мл)  
 Люминесценция 22 ч



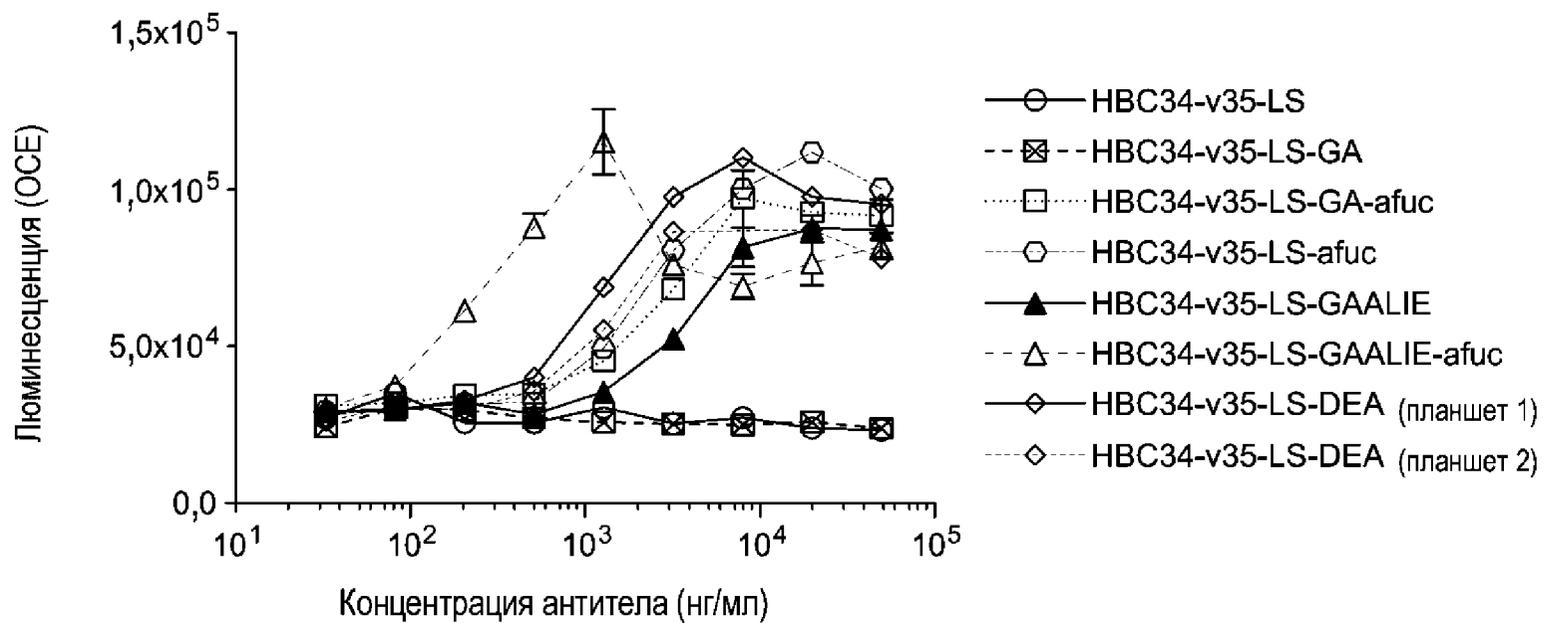
Фиг. 17А

Активация Jurkat-FcγRIIIa (H131) с помощью HBsAg  
 Проспек (1,14 мкг/мл - 250 Ед/мл)  
 Люминесценция 25 ч



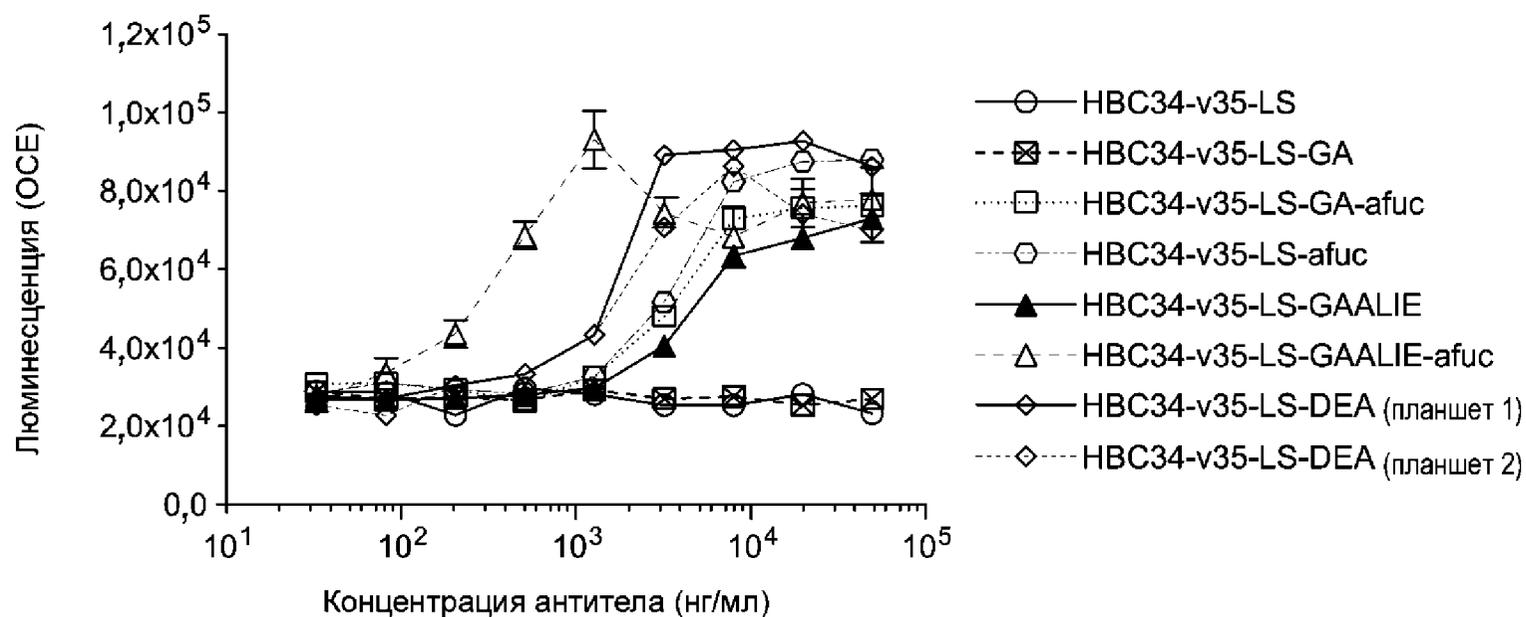
Фиг. 17В

Активация Jurcat-FcγRIIIa (F158) с помощью HBsAg  
 Проспек (22,72 мкг/мл - 5000 Ед/мл)  
 Люминесценция 22 ч



Фиг. 17С

Активация Jurcat-FcgRIIIa (F158) с помощью HBsAg  
 Проспек (22,72 мкг/мл - 5000 Ед/мл)  
 Люминесценция 25 ч



Фиг. 17D

Fc-LS	IIA-H	IIA-R	IIB	IIA <sub>H</sub> /IIB	IIA <sub>R</sub> /IIB	IIIA-V	IIIA-F	IIIB	C1q	Tm	FcRn
				Отношение	Отношение					°C	
GAALIE	3,8	2,5	0,8	4,7	3,1	2,1	14,4	1,9	нет связывания	56,5	0,68
GA	10	6,9	1,1	9,9	6,6	0,52	0,93	0,84	0,35	68,4	0,95
GRLR	0,28	0,38	0,38	0,72	1,00	0,08	0,25	0,70	нет связывания	65,7	0,69
GALVQE	11	14	1,1	10	13	0,16	0,27	0,88	0,08	61,1	0,81
GAYL	16	3,7	1,0	17	3,9	0,48	0,78	0,85	1,09	65,9	0,88
GARPYL	9,9	2,4	0,85	12	2,8	1,8	3,4	1,1	1,39	69,3	0,60
GARPIN	22	5,4	0,6	37	8,9	1,3	1,5	0,84	0,29	69,8	1,54

Фиг. 18

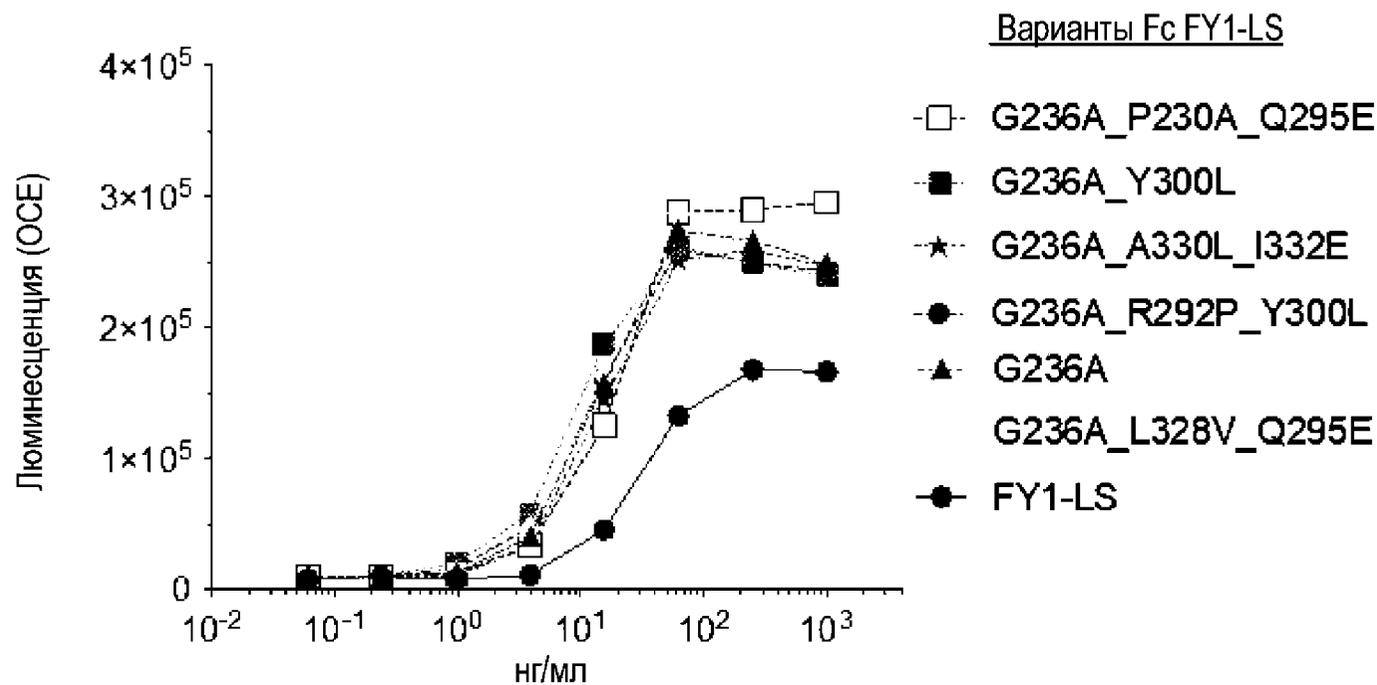
Fc	IIA-H	IIA-R	IIB	IIA <sub>H</sub> /IIB	IIA <sub>R</sub> /IIB	IIIA-V	IIIA-F	IIIB	C1q	Tm	FcRn
				Отношение	Отношение						
GAALIE	3,6	1,4	0,6	6,0	2,3	2,0	12,2	1,8	нет связывания	58,8	0,9
GAALIE-LS	2,9	1,3	0,4	6,8	3,0	1,6	9,4	1,4	нет связывания	58,0	12,3
GA	5,9	4,8	0,6	9,4	7,7	0,4	0,6	нет связывания	0,59	72,6	1,0
GA	12,1	6,3	1,1	11,5	6,0	0,6	0,8	0,82	0,36	71,1	1,0
GRLR	нет связывания	нет связывания	0,2	н.д.	н.д.	нет связывания	нет связывания	0,61	нет связывания	68,6	1,0
GALVQE	7,8	10,8	0,9	9,0	12,5	0,4	0,5	0,70	0,07	61,0	1,1
GAYL	18,2	4,6	1,1	17,3	4,4	0,9	1,0	0,97	0,98	69,6	1,0
GARPYL	14,2	2,7	0,9	15,1	2,9	2,7	3,7	1,03	1,01	>70	0,8
GARPIN	7,8	1,3	0,5	14,3	2,4	1,0	1,1	0,96	0,24	72,9	0,9

Фиг. 19

<b>Fc</b>	<b>IIA-H</b>	<b>IIA-R</b>	<b>IIB</b>	<b>IIA<sub>H</sub>/IIB</b>	<b>IIA<sub>R</sub>/IIB</b>	<b>IIIA<sub>V</sub></b>	<b>IIIA<sub>F</sub></b>	<b>IIIB</b>	<b>C1q</b>	<b>Tm</b>
				Отношение	Отношение					°C
GAALIE-afuc	3,1	1,6	0,6	5,1	2,6	28,0	242	14,8	нет связывания	59,4
GAALIE-LS-afuc	2,3	1,1	0,4	6,5	3,3	30,2	256	12,3	нет связывания	58,5
GA-afuc	5,4	6,1	0,6	8,4	9,5	6,7	17,2	2,1	0,16	73,0
GA-afuc	9,5	9,9	1,1	8,4	8,7	13,6	35,6	1,8	н.д.	71,6
GRLR-afuc	нет связывания	нет связывания	0,2	н.д.	н.д.	нет связывания	нет связывания	нет связывания	н.д.	68,9
GALVQE-afuc	6,7	9,6	1,0	6,8	9,8	7,4	11,8	2,4	н.д.	61,6
GAYL-afuc	14,9	4,0	0,9	16,0	4,2	13,7	30,1	2,6	н.д.	69,6
GARPYL-afuc	11,2	2,2	1,0	11,0	2,2	9,1	19,7	1,8	н.д.	>70
GARPIN-afuc	5,5	1,4	0,6	9,2	2,3	7,1	14,8	1,2	н.д.	74,2

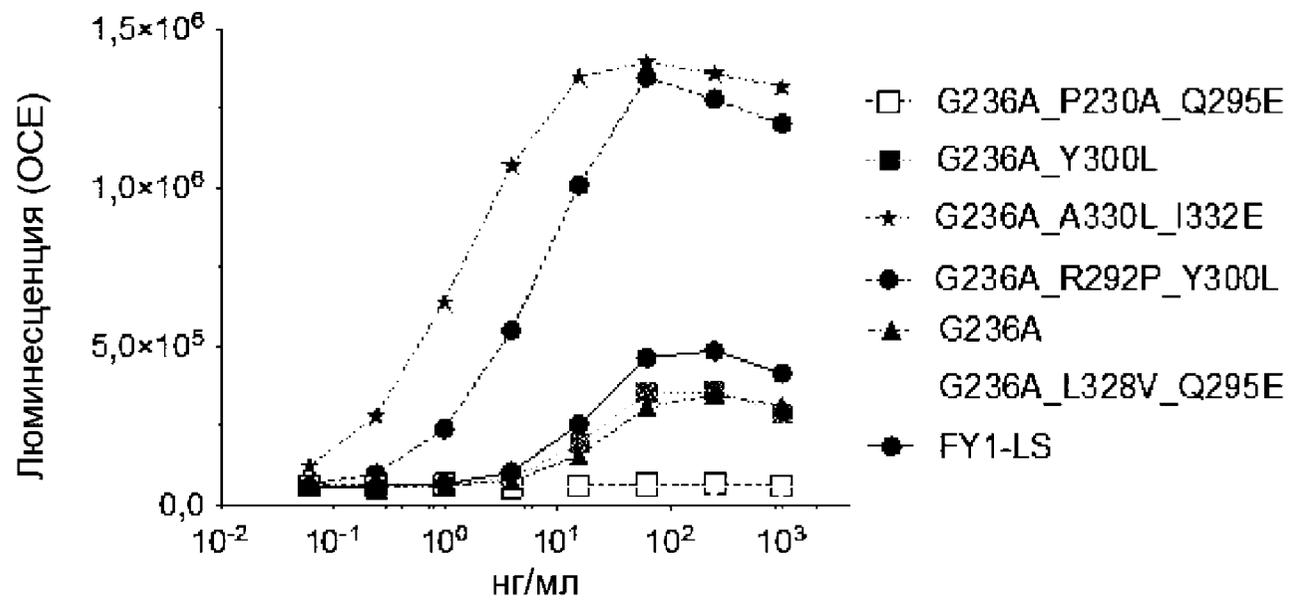
Фиг. 20

**Мишени: A549, экспрессирующие ГА H1N1 FluA**  
Активация репортерных клеток Jurkat FcγRIIa (H131)



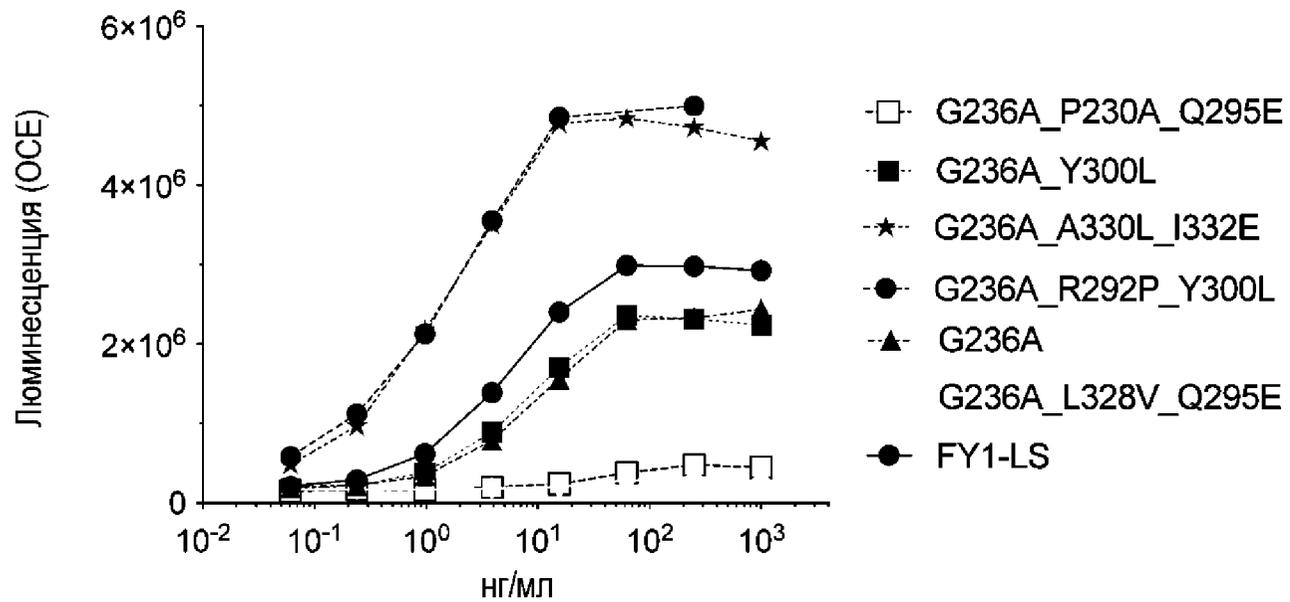
Фиг. 21

**Мишени: A549, экспрессирующие ГА H1N1 FluA**  
Активация репортерных клеток FcγRIIIa (F158, низкоаффинный)

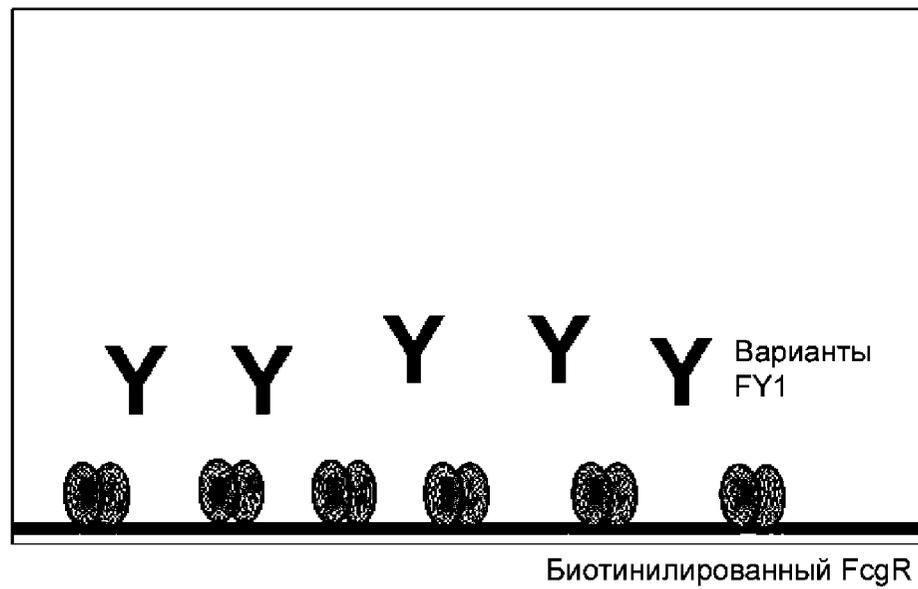


Фиг. 22А

Мишени: A549, экспрессирующие ГА H1N1 FluA  
 Активация репортерных клеток Jurkat FcγRIIIa  
 (V158, более высокая аффинность)



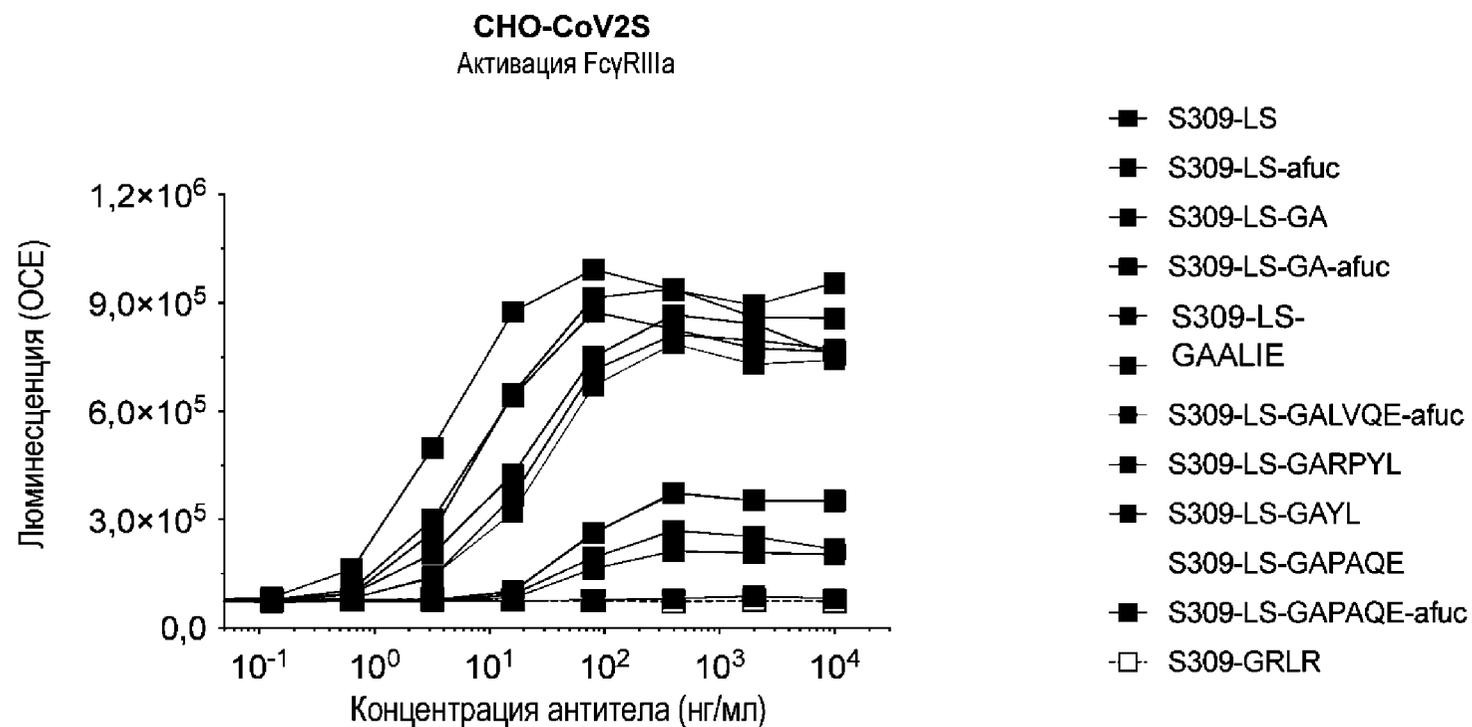
Фиг. 22В



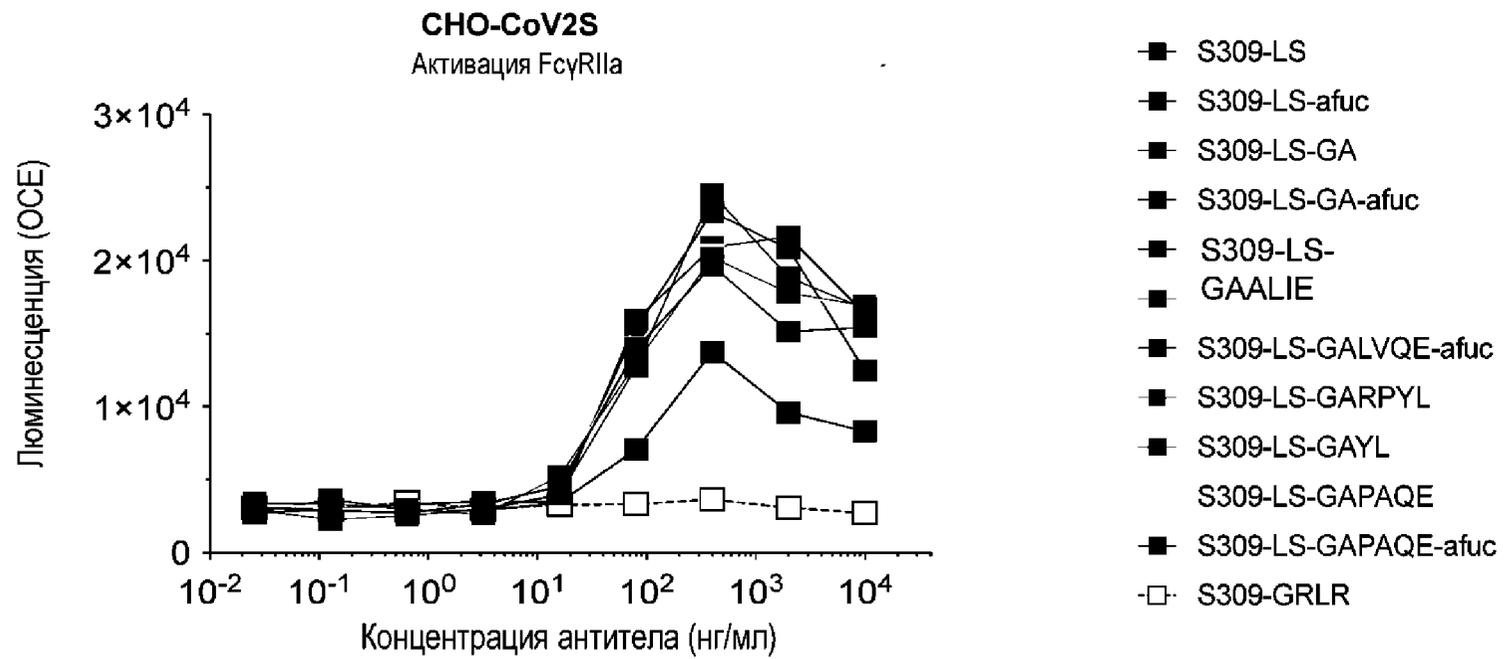
Фиг. 23

Вариант FY1	FcgRI FC	FcgRIIa (H) FC	FcgRIIa (R) FC	FcgRIIb FC	FcgRIIIa (V) FC	FcgRIIIa (F) FC
FY1-rlgG1m3-LS	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
FY1-rlgG1m3-LS-G236A-K334A-Q295E	0,55	4,00	2,44	0,97	0,24	-
FY1-rlgG1m3-LS-G236S-G420V-G446E-L309T	0,10	3,85	1,79	0,85	0,12	-
FY1-rlgG1m3-LS-G236A	0,25	5,56	3,45	1,61	0,59	1,09
FY1-rlgG1m3-LS-Q295E	0,87	1,04	0,85	-	0,49	1,35
FY1-rlgG1m3-LS-R292P	0,67	0,40	-	-	0,98	0,91
FY1-rlgG1m3-LS-G236A-R292P-I377N	0,25	3,33	1,16	-	0,81	-
FY1-rlgG1m3-LS-L328V	0,92	0,72	1,35	-	0,78	1,33
FY1-rlgG1m3-LS-K334A	1,79	0,56	0,55	1,45	2,17	2,22
FY1-rlgG1m3-LS-G236A-A330L-I332E	1,54	2,70	1,69	-	2,50	6,25
FY1-rlgG1m3-LS-A330L-I332E	3,13	0,43	0,14	0,30	5,00	7,14
FY1-rlgG1m3-LS-P230A	0,89	-	0,94	-	-	1,28
FY1-rlgG1m3-LS-S239D-H268E-G236A	1,61	10,00	20,00	10,71	4,76	5,88
FY1-rlgG1m3-LS-G236A-Y300L	0,32	7,14	3,13	0,33	0,53	0,74
FY1-rlgG1m3-LS-G236A-R292P-Y300L	0,34	6,67	2,63	0,85	1,69	2,17
FY1-rlgG1m3-LS-G446E	0,88	0,89	0,92	0,97	1,16	1,04
FY1-rlgG1m3-LS-G236A-P230A-Q295E	0,30	5,26	2,70	0,54	-	-
FY1-rlgG1m3-LS-Y300L	1,12	1,47	0,68	0,64	1,33	1,47
FY1-rlgG1m3-LS-L309T-P238D-P396L-T366A	0,06	-	-	5,85	-	-
FY1-rlgG1m3-LS-I377N	1,04	1,30	1,25	2,15	1,64	1,79
FY1-rlgG1m3-LS-G236R-L328R	-	-	-	-	-	-
FY1-rlgG1m3-LS-G236A-L328V-Q295E	0,23	4,76	4,00	0,62	-	-

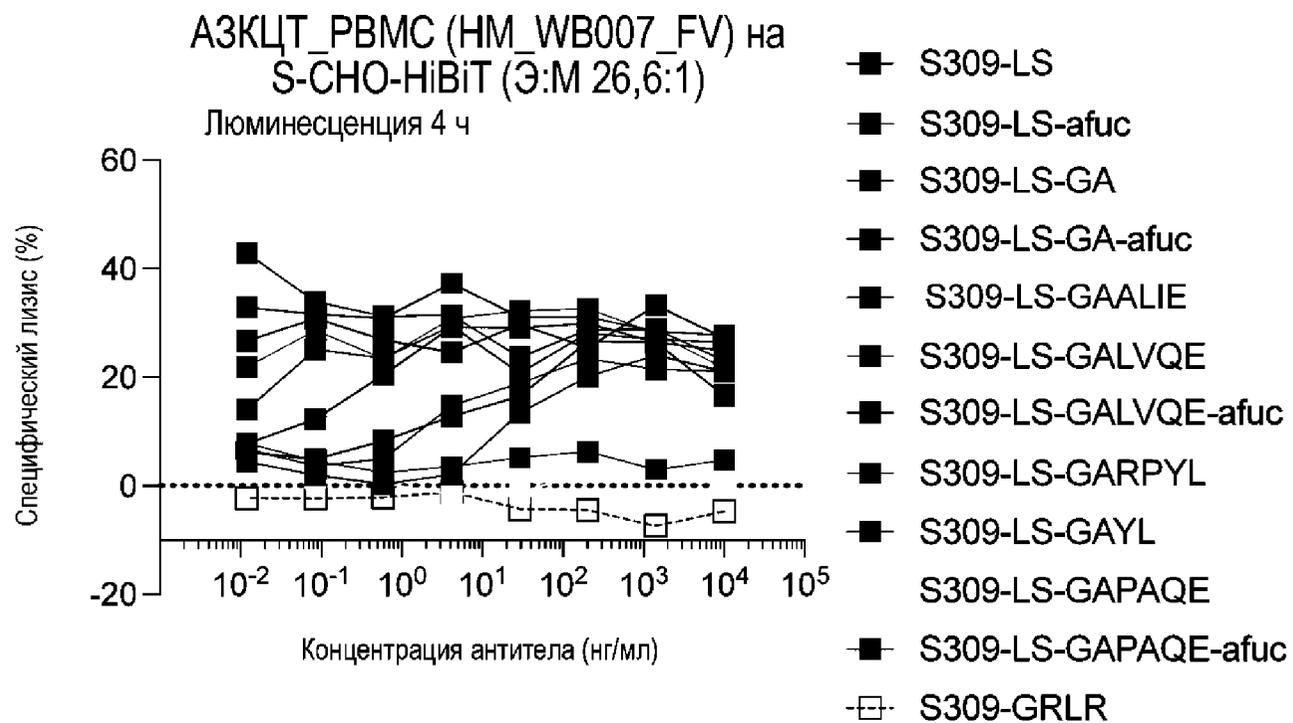
Фиг. 24



Фиг. 25А

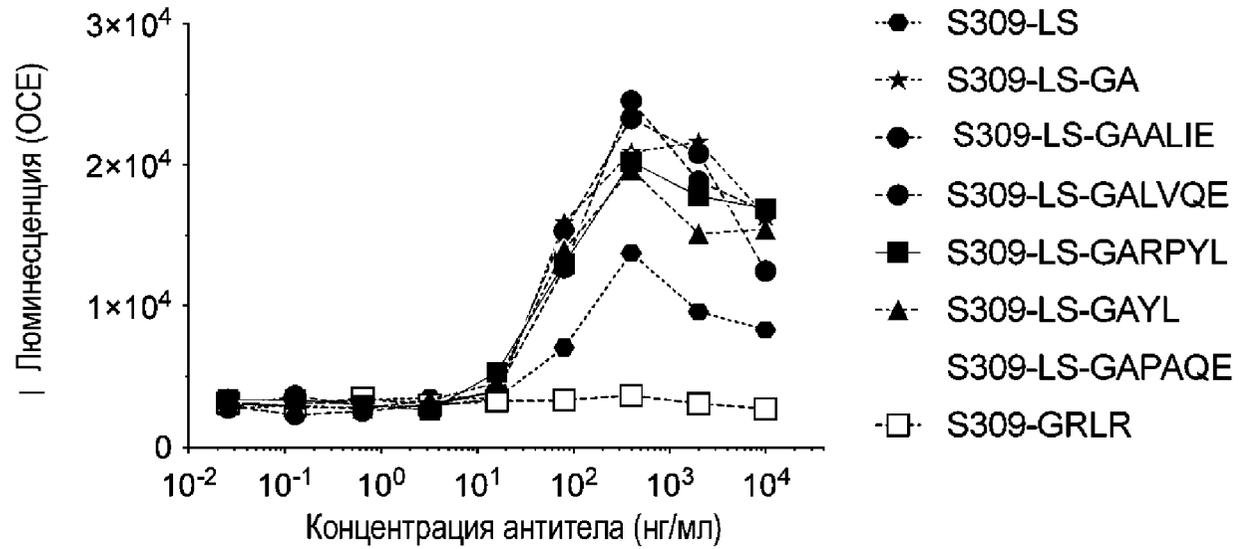


Фиг. 25В



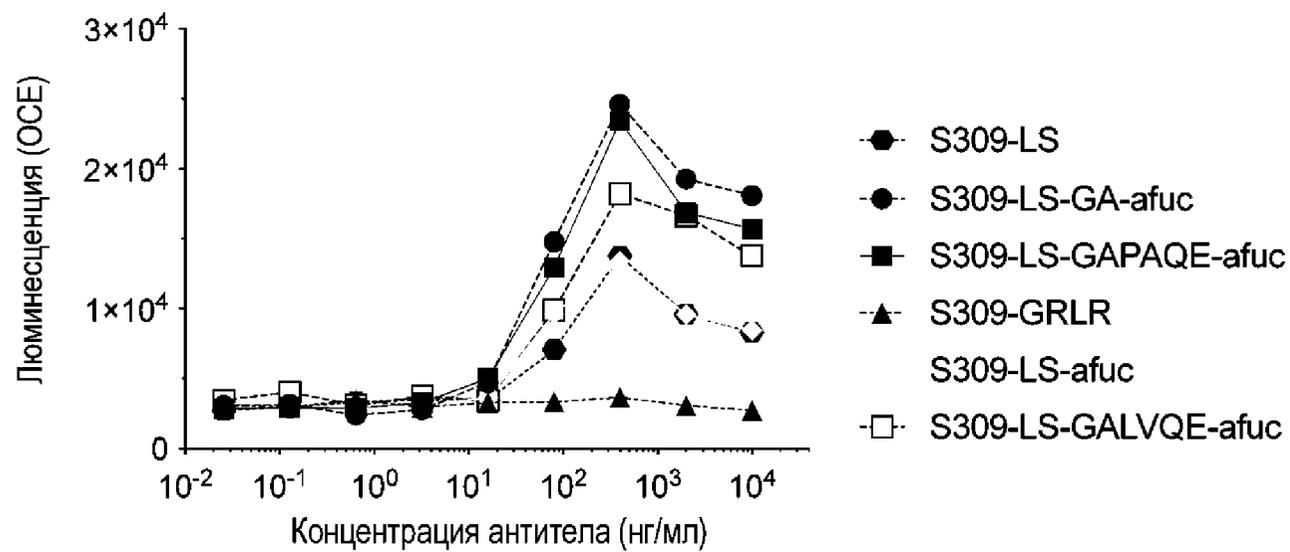
Фиг. 25С

**Мишени: CHO, экспрессирующие спайковый белок SARS-CoV-2**  
Активация репортерных клеток Jurkat FcγRIIa (H131)  
(фукозилированный)



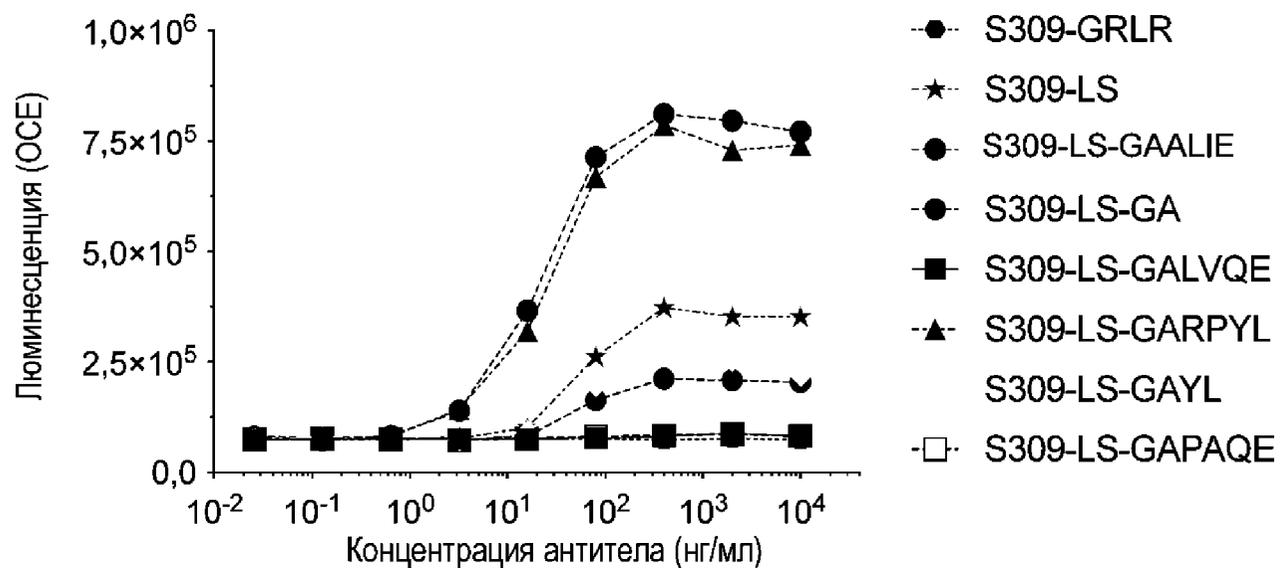
Фиг. 26А

**Мишени: CHO, экспрессирующие спайковый белок SARS-CoV-2**  
 Активация репортерных клеток Jurkat FcγRIIa (H131)  
 (афукозилированные варианты Fcs)



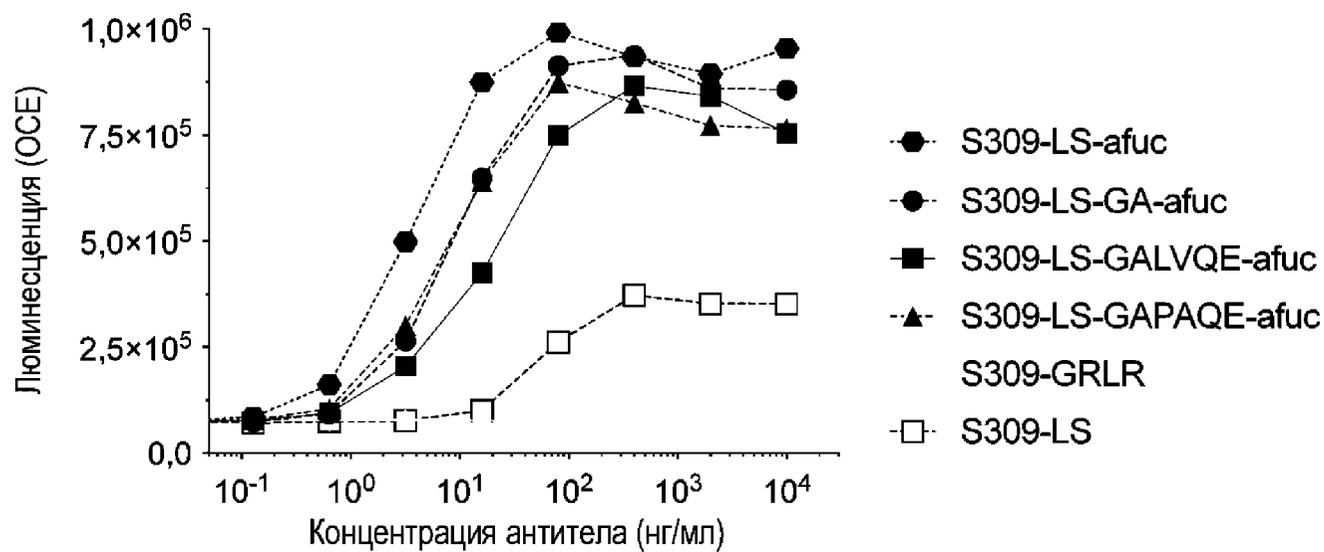
Фиг. 26В

**Мишени: CHO, экспрессирующие спайковый белок SARS-CoV-2**  
 Активация репортерных клеток Jurkat FcγRIIIa (V158)  
 (фукозилированный)

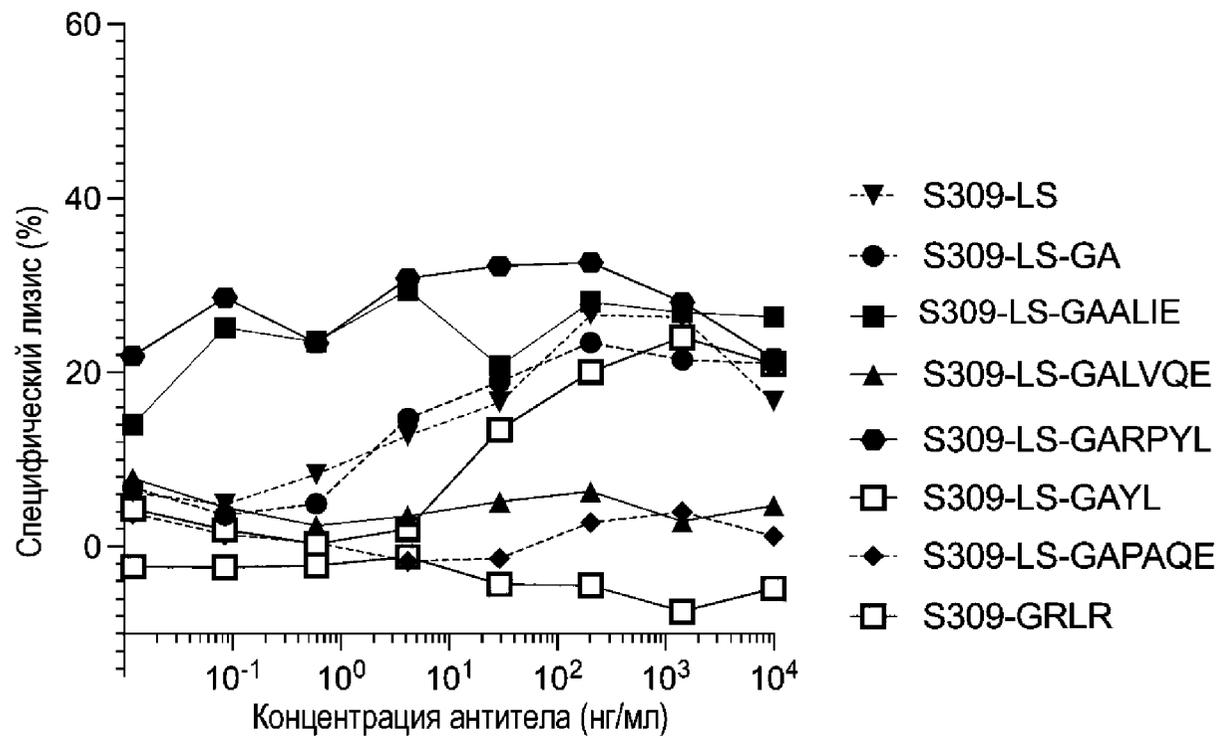


Фиг. 26С

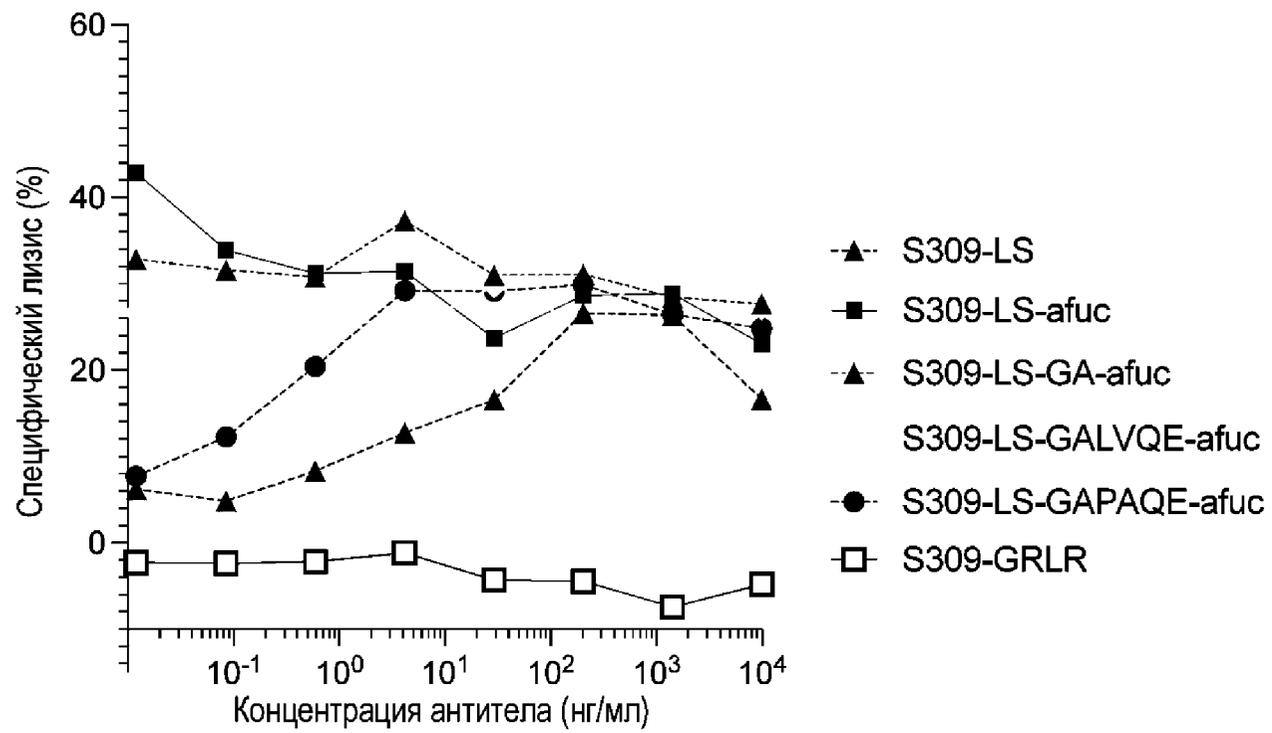
Мишени: CHO, экспрессирующие спайковый белок SARS-CoV-2  
Активация репортерных клеток Jurkat FcγRIIIa (V158)  
(афукозипированные варианты Fc)



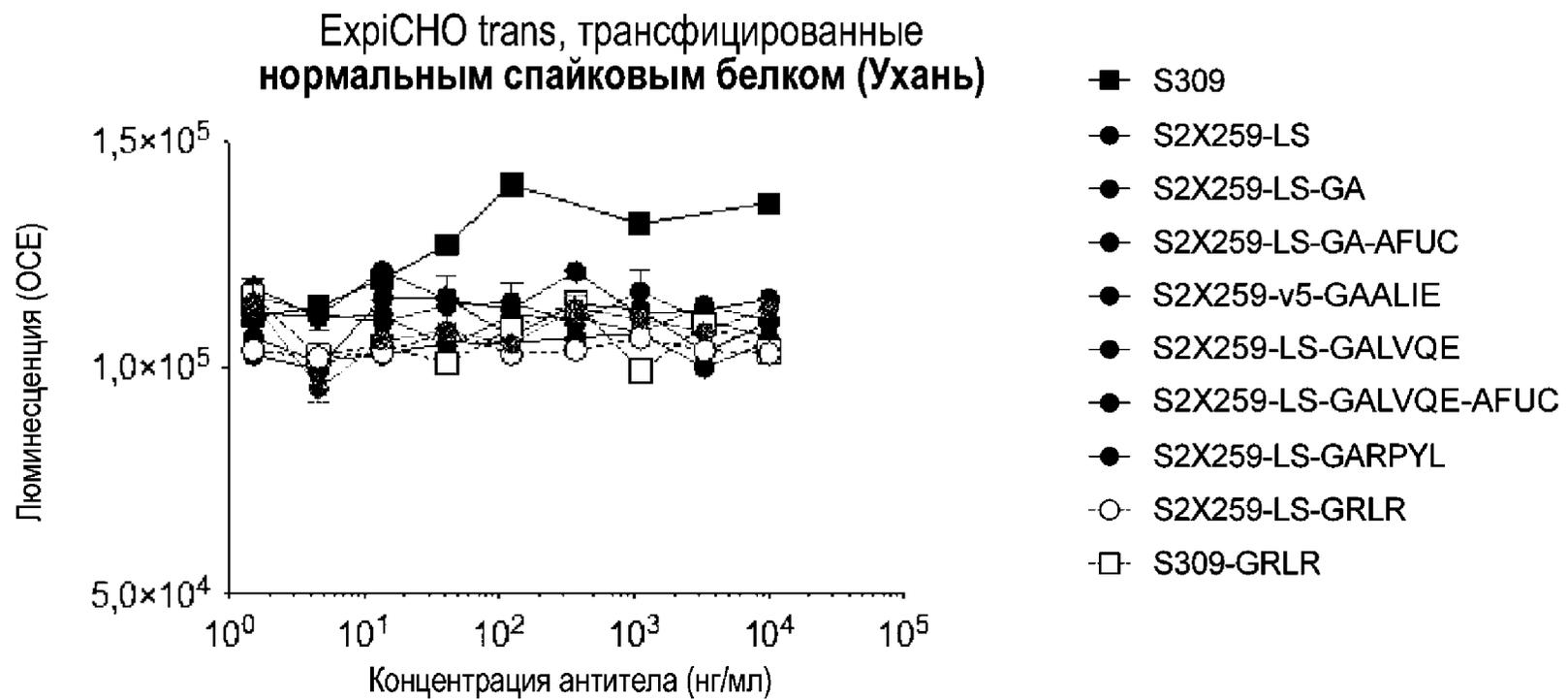
Фиг. 26D



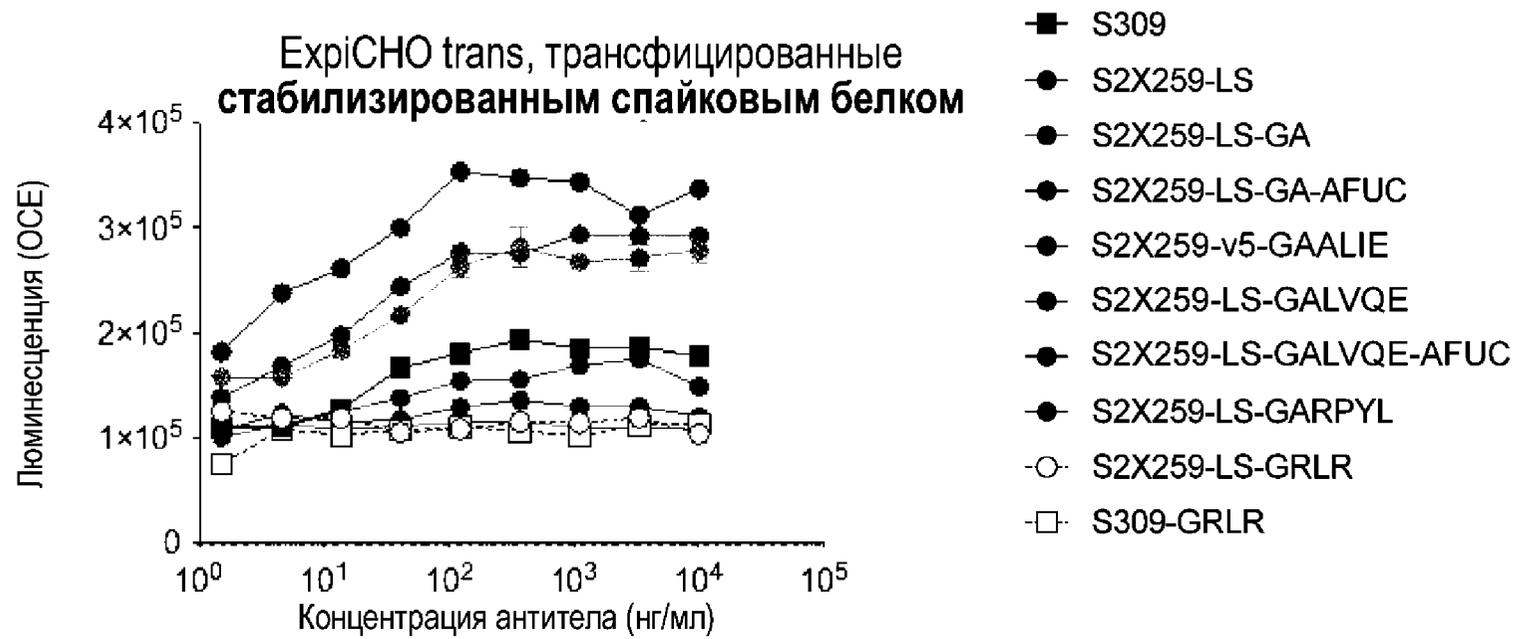
Фиг. 26Е



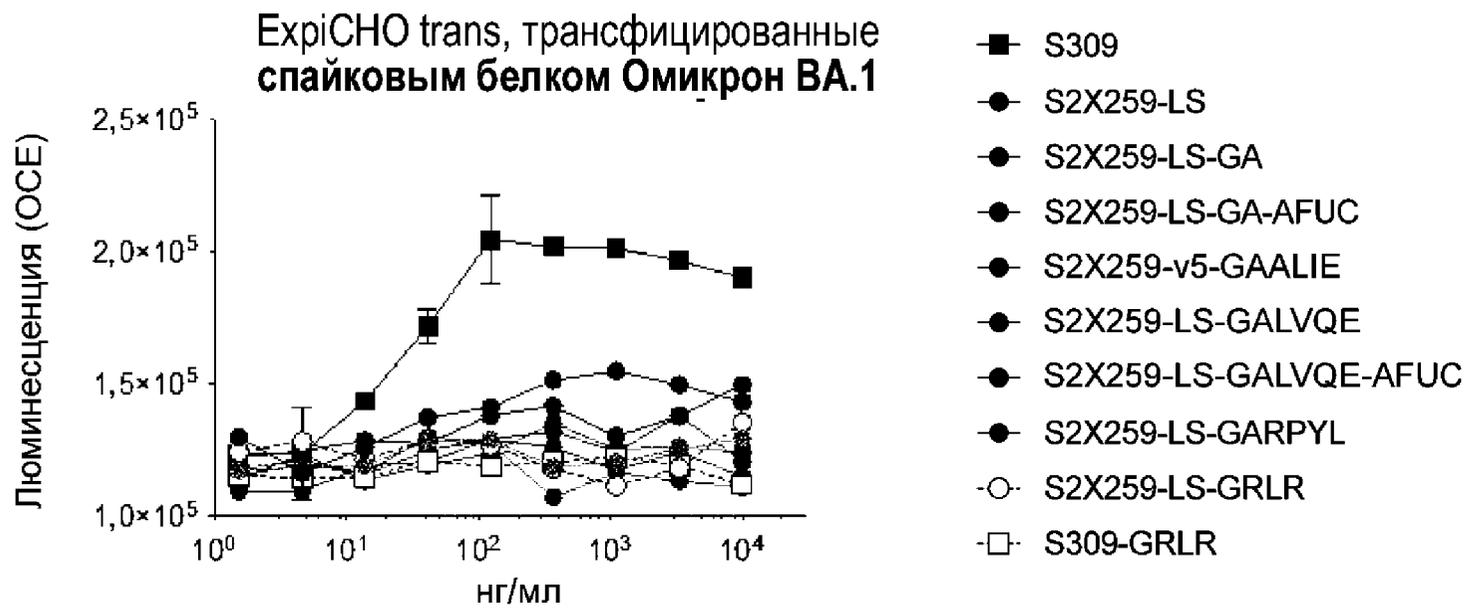
Фиг. 26F



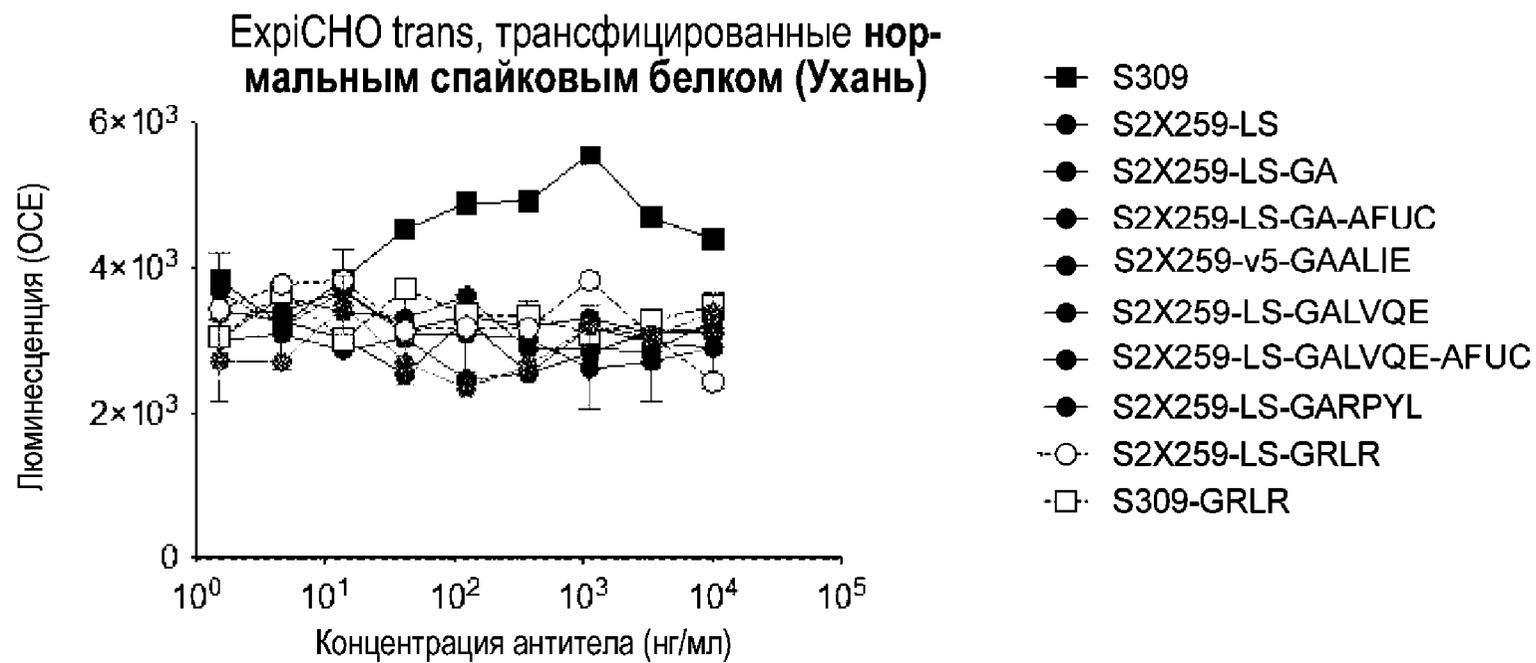
Фиг. 27А



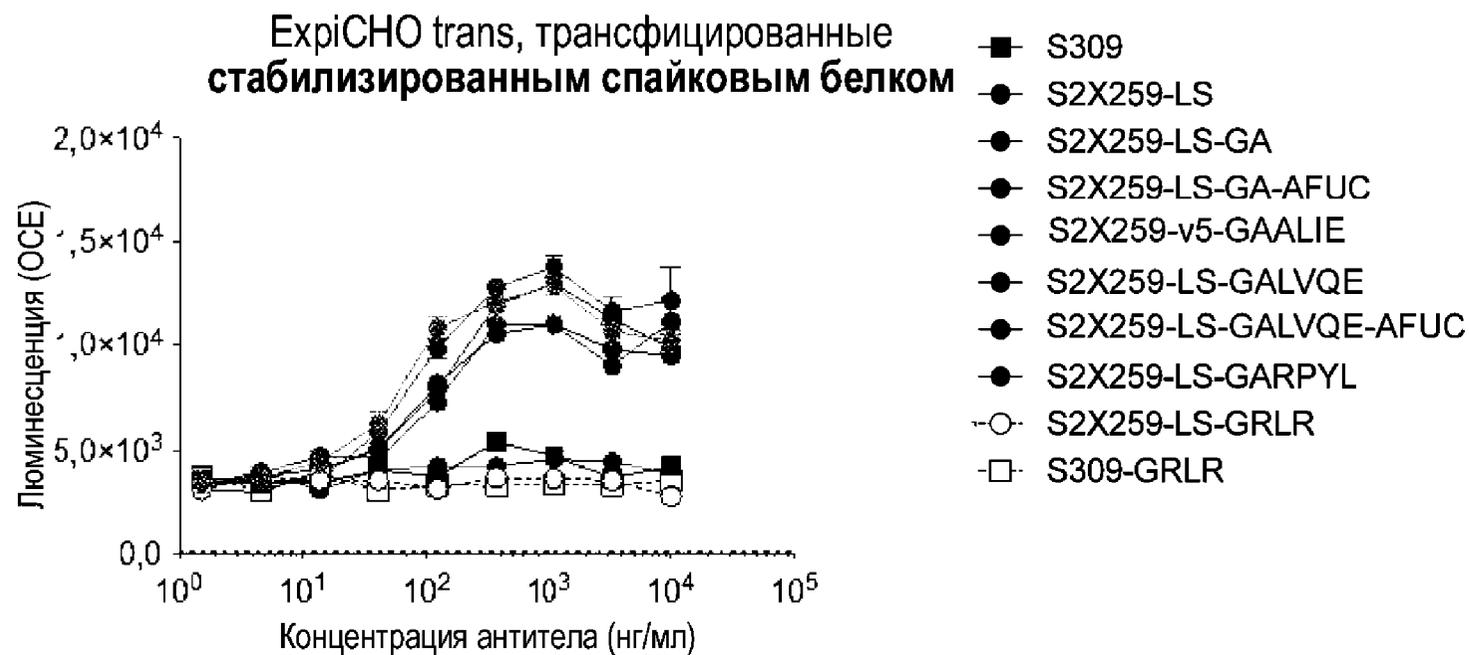
Фиг. 27В



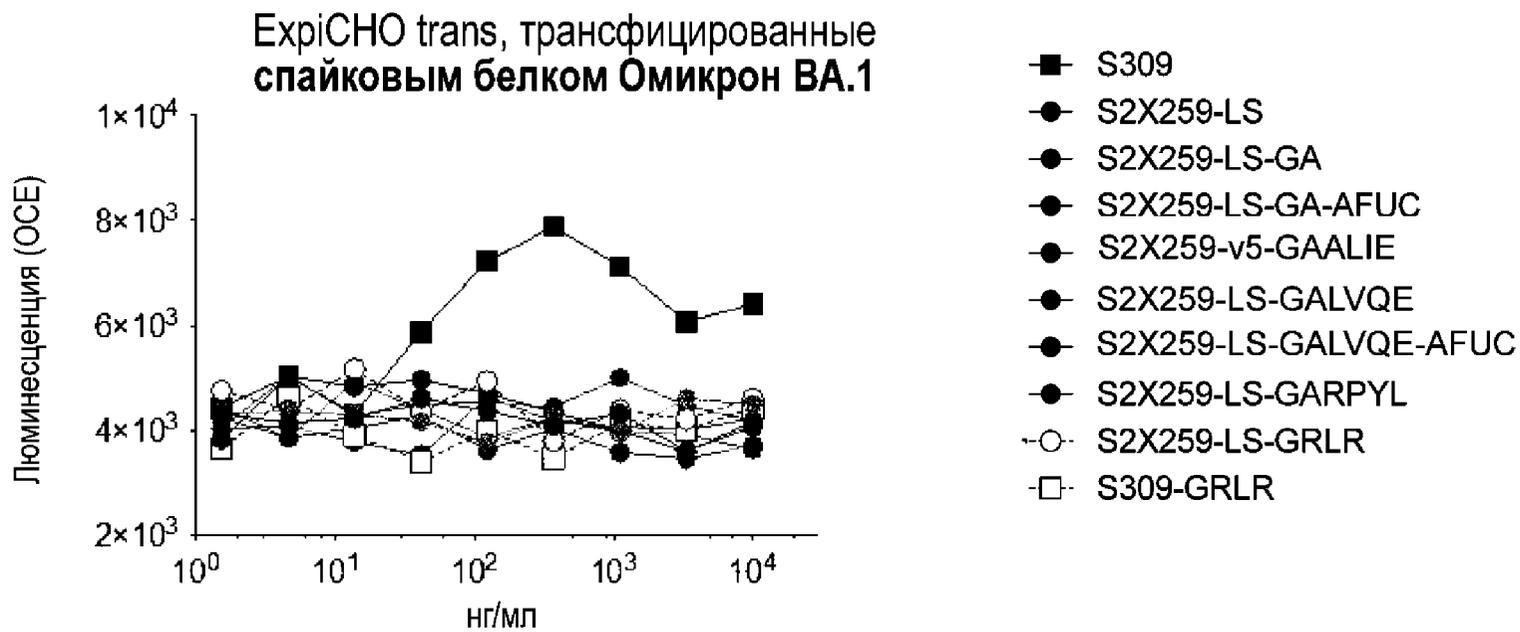
Фиг. 27С



Фиг. 27D



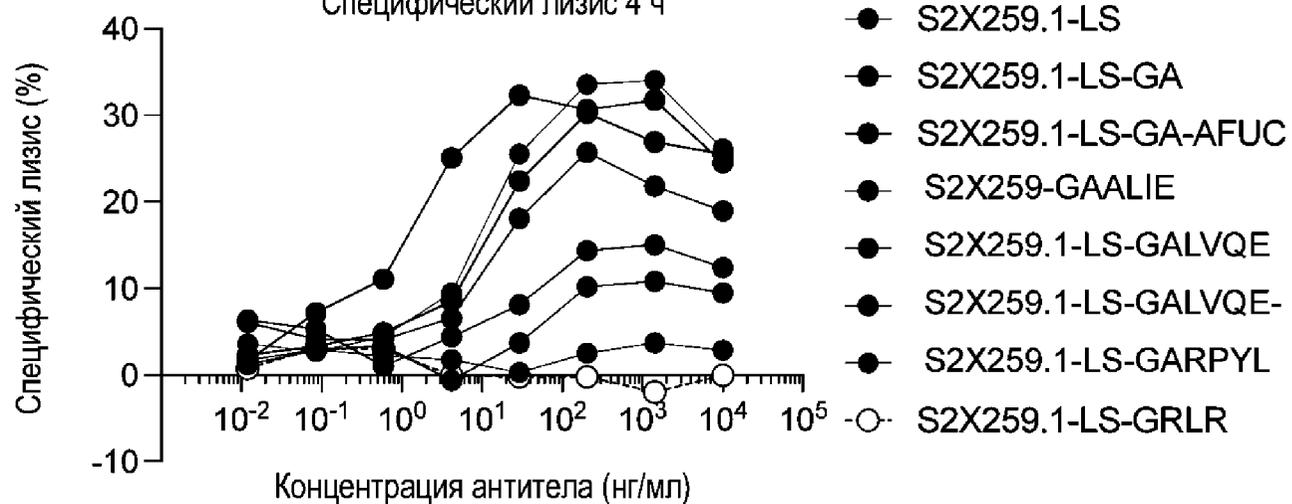
Фиг. 27Е



Фиг. 27F

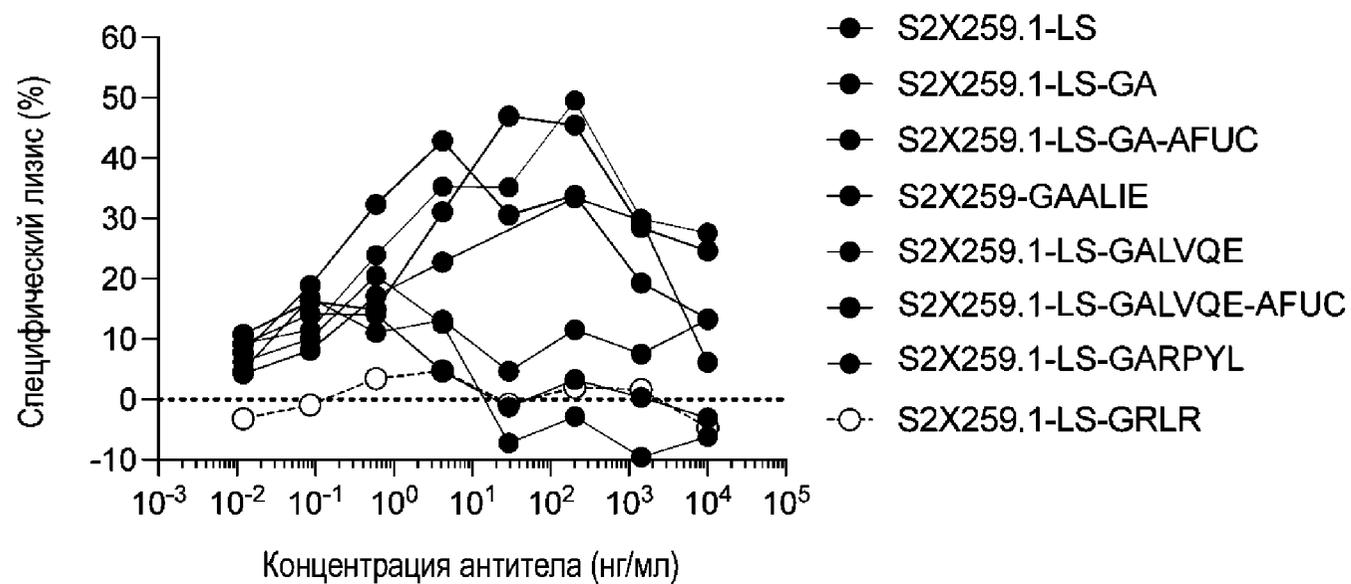
АЗКЦТ\_МНКПК (НМ\_WB007\_FV) на  
S-CHO-НіВіТ (Э:М 26,6:1)

Специфический лизис 4 ч



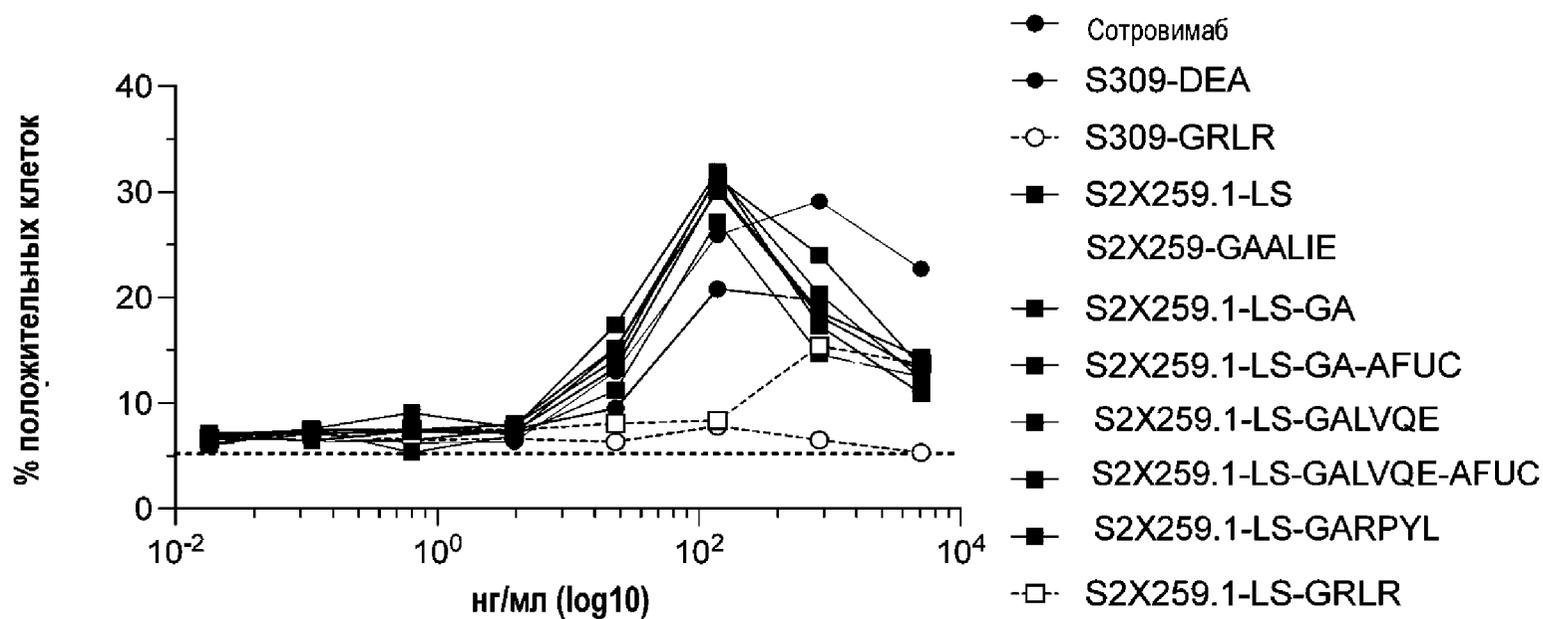
Фиг. 27G

АЗКЦТ\_МНКПК (НМ\_WB002\_VV)  
 на S-CHO-HiViT (E:T 40:1)  
 Специфический лизис 4 ч



Фиг. 27H

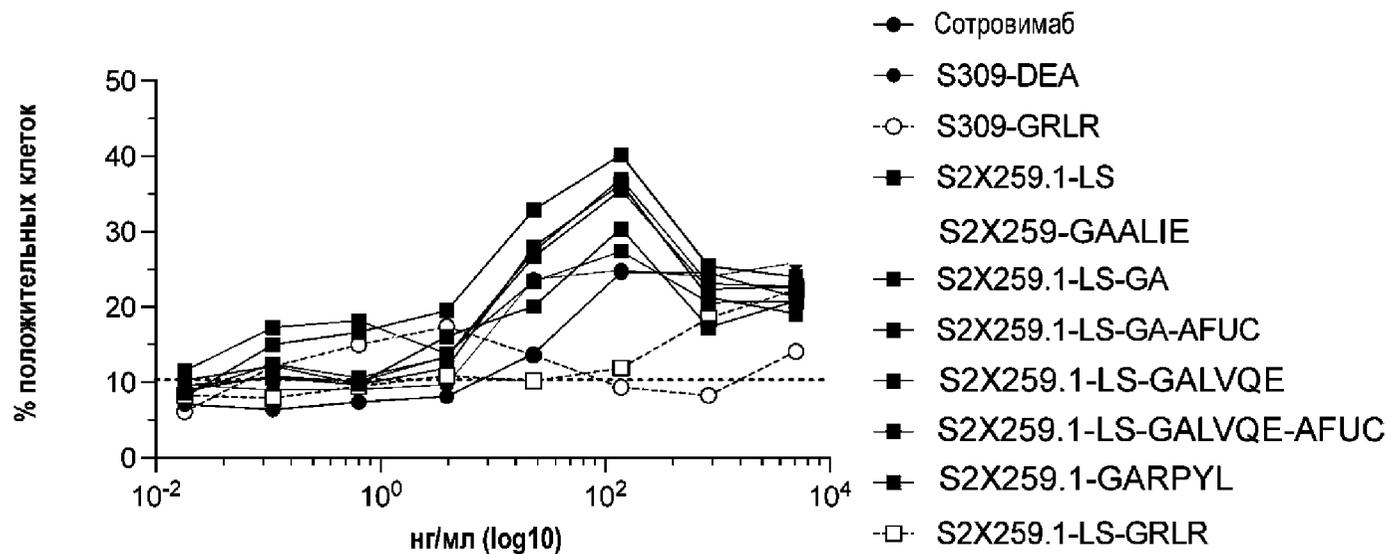
Анализ АЗКФ на CHO-CoV2S  
 Отношение Э:М 20:1\_ON  
 Моноциты CD14+ (HM\_WB023\_FF\_RH) - дважды положительные



пунктирная линия указывает значение для мишени+эффектора без антитела

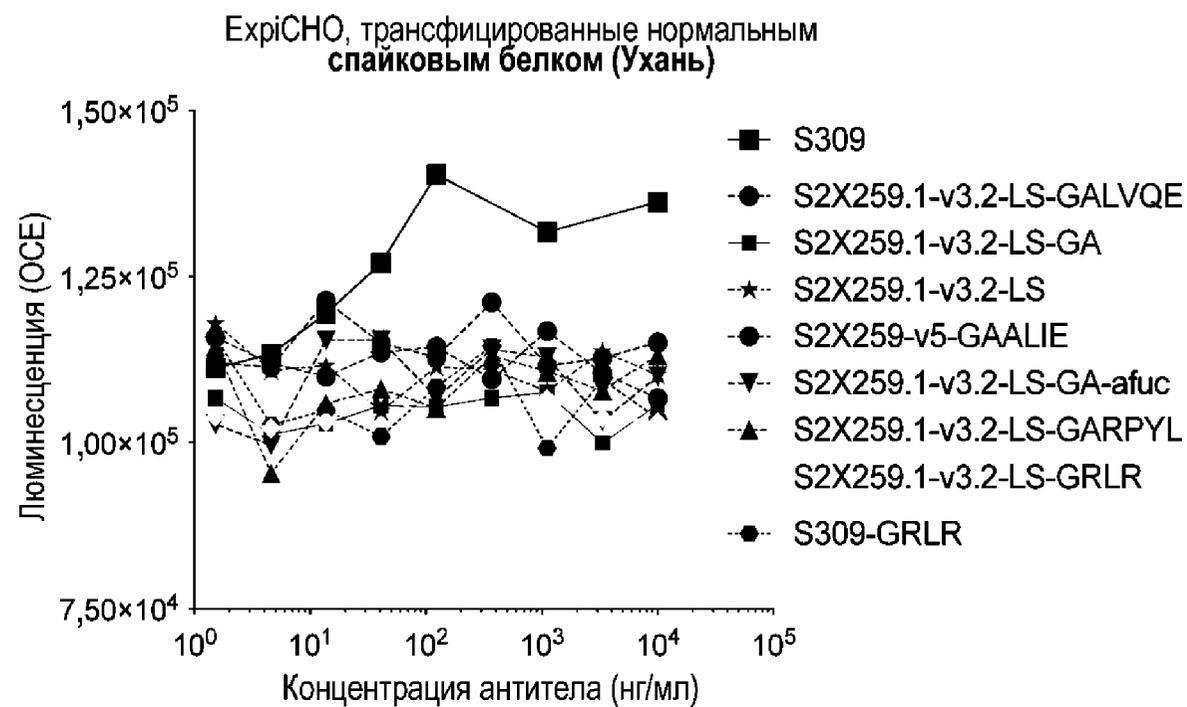
Фиг. 271

Анализ АЗКФ на  
 CHO-CoV2S  
 Отношение Э:М 20:1\_ON  
 Моноциты CD14+ (HM\_WB007\_FV\_RH) - дважды положительные



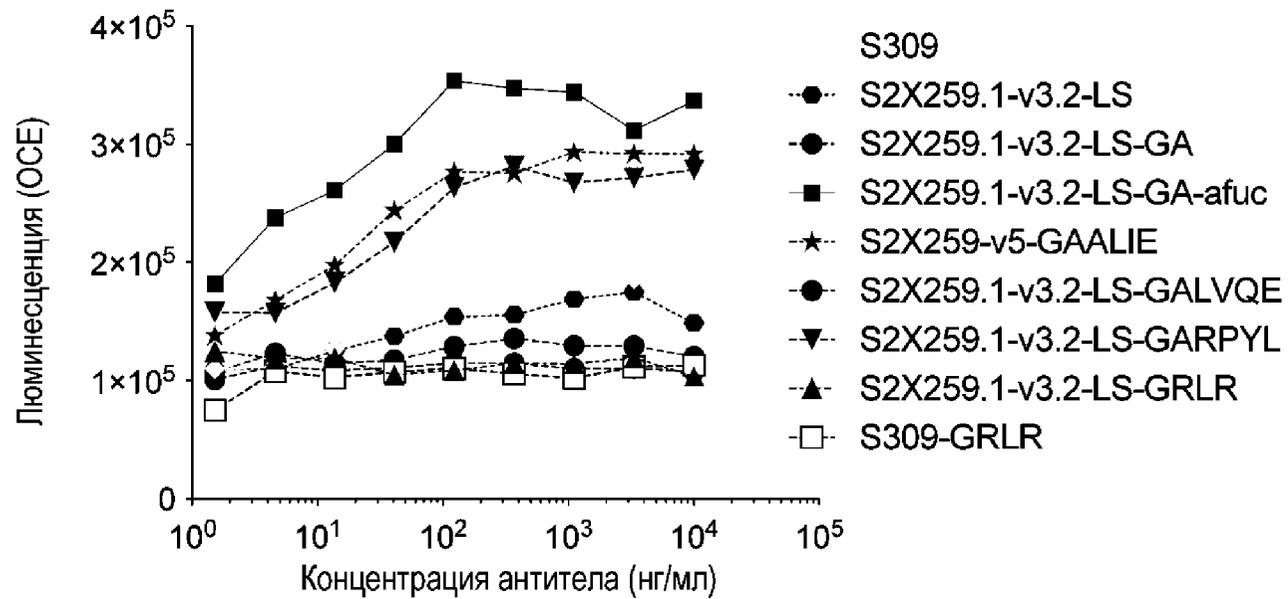
пунктирная линия указывает значение для мишени+эффектора без антитела

Фиг. 27J

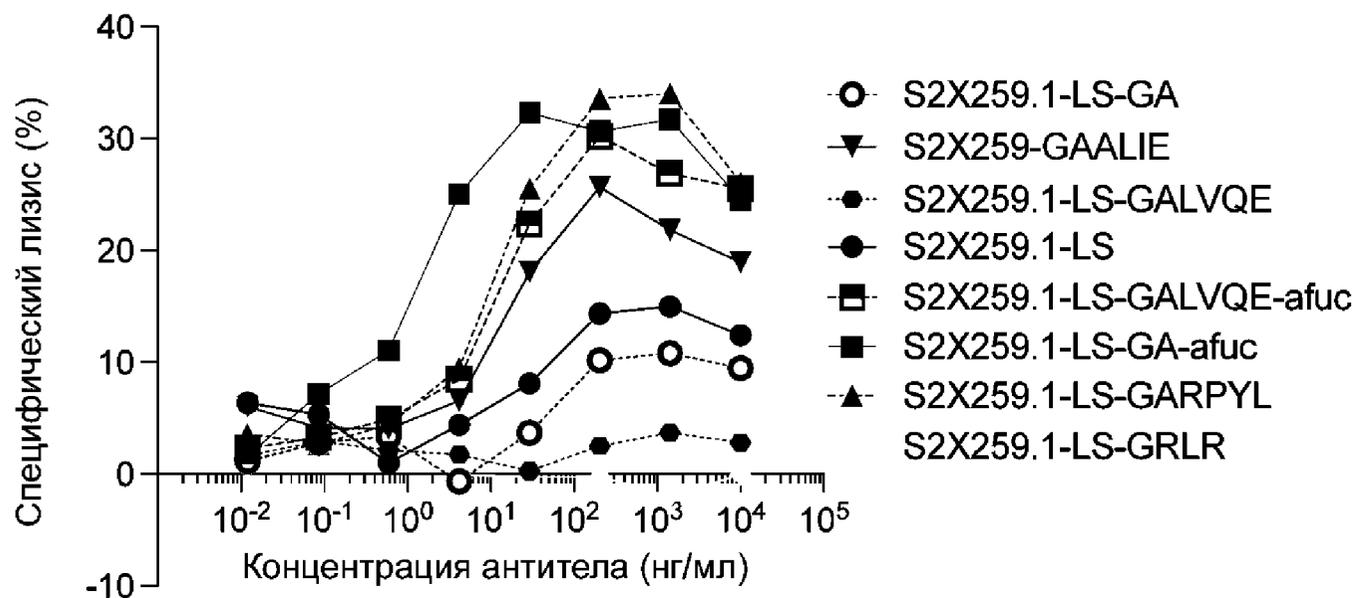


Фиг. 28А

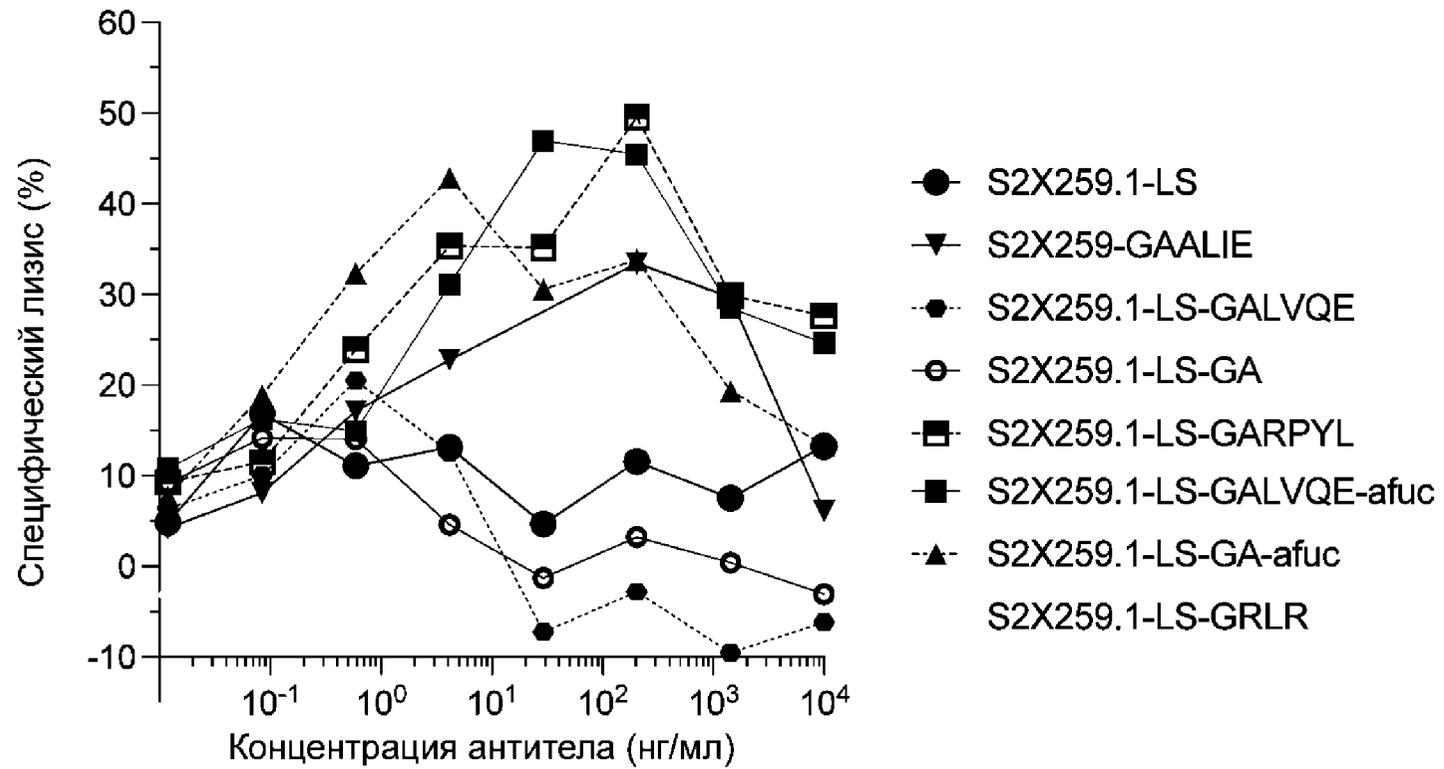
Exp1CHO, трансфицированные  
стабилизированным спайковым белком



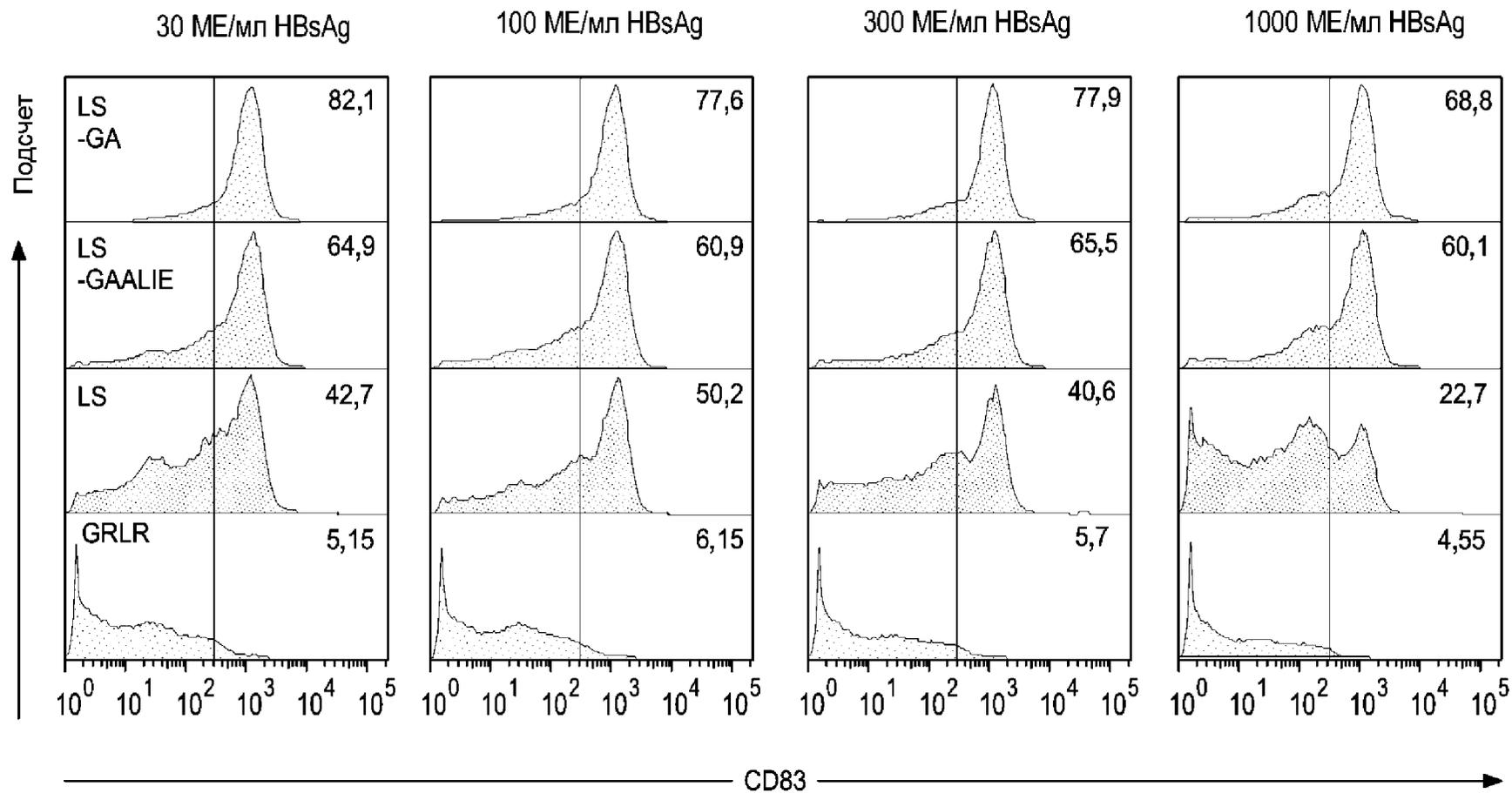
Фиг. 28В



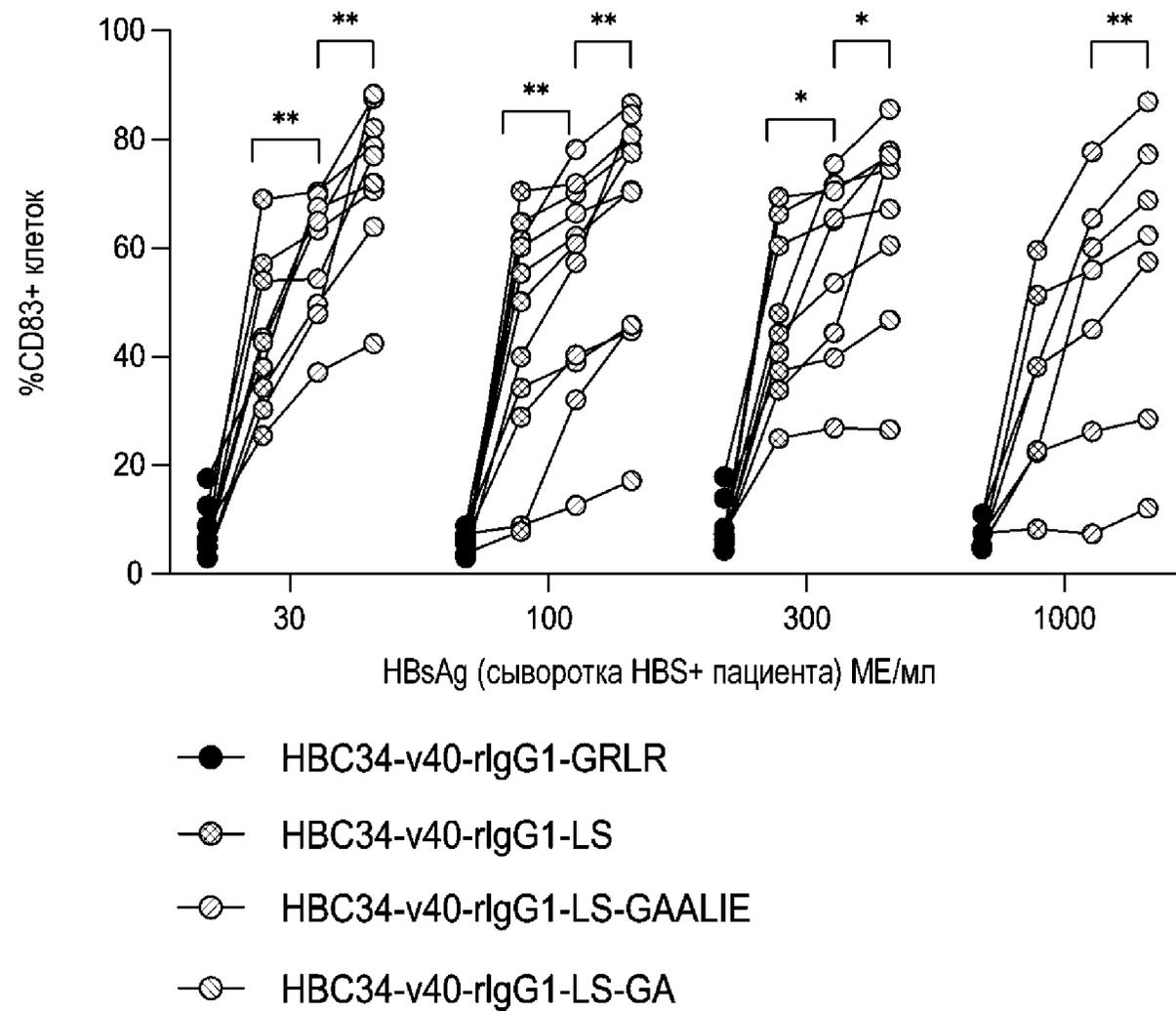
Фиг. 28С



Фиг. 28D

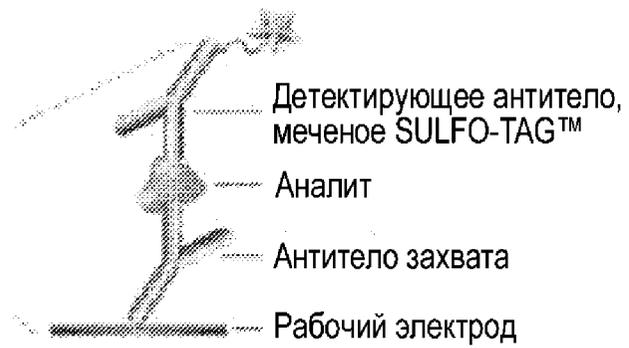
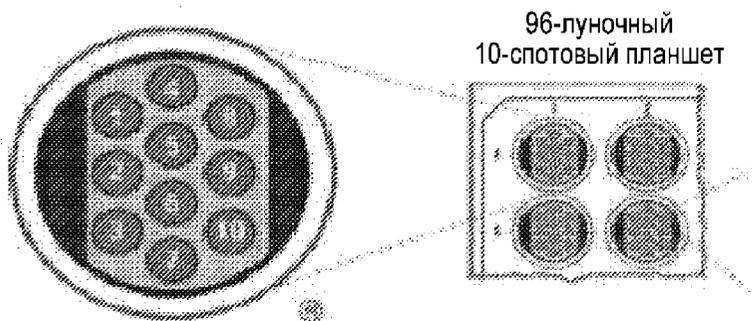


Фиг. 29А

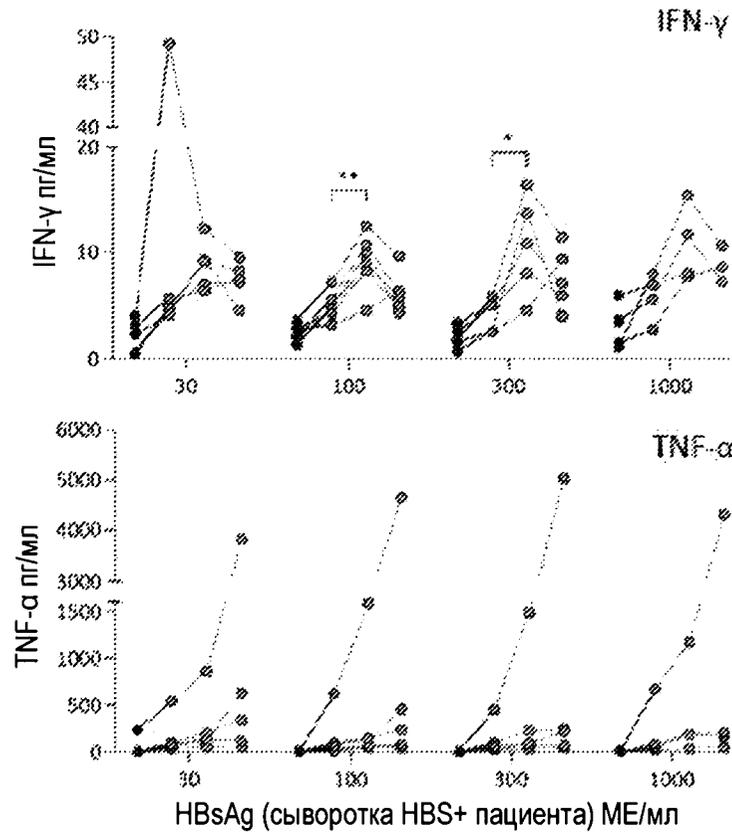
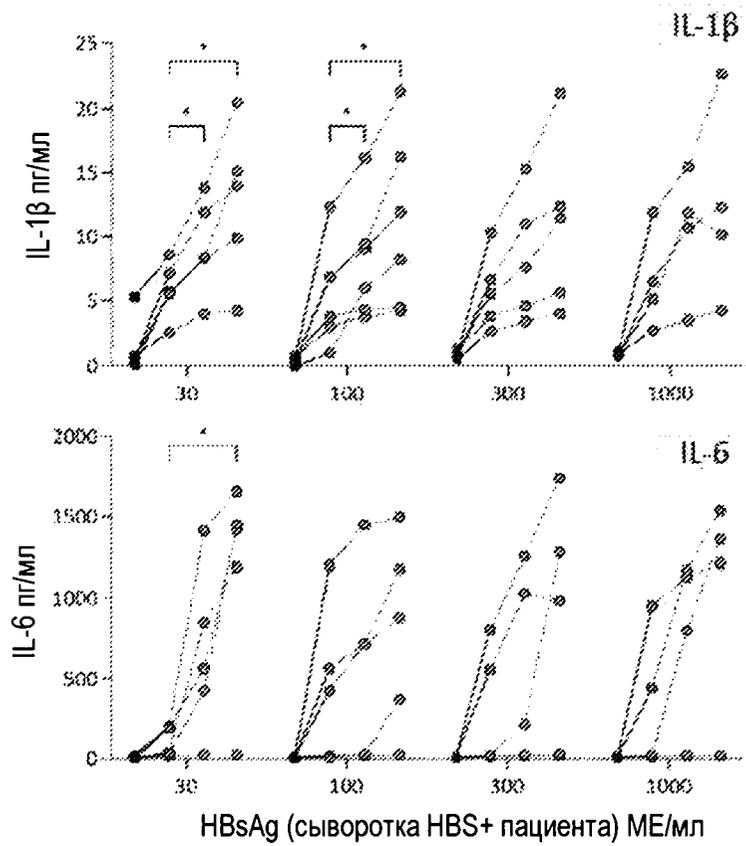


Фиг. 29В

1. IFN- $\gamma$
2. IL-1 $\beta$
3. IL-2
4. IL-4
5. IL-6
6. IL-8
7. IL-10
8. IL-12p70
9. IL-13
10. TNF- $\alpha$

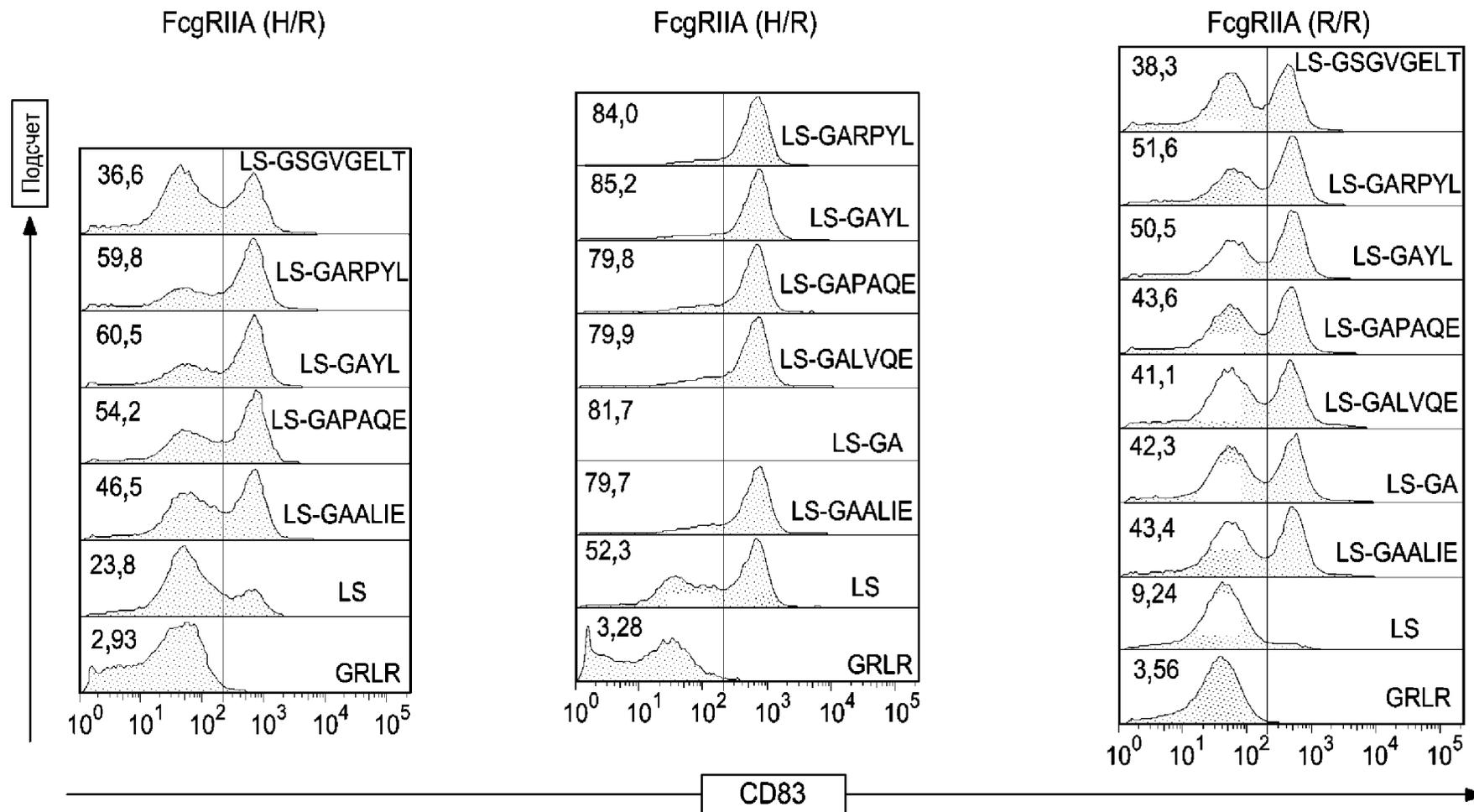


Фиг. 29С

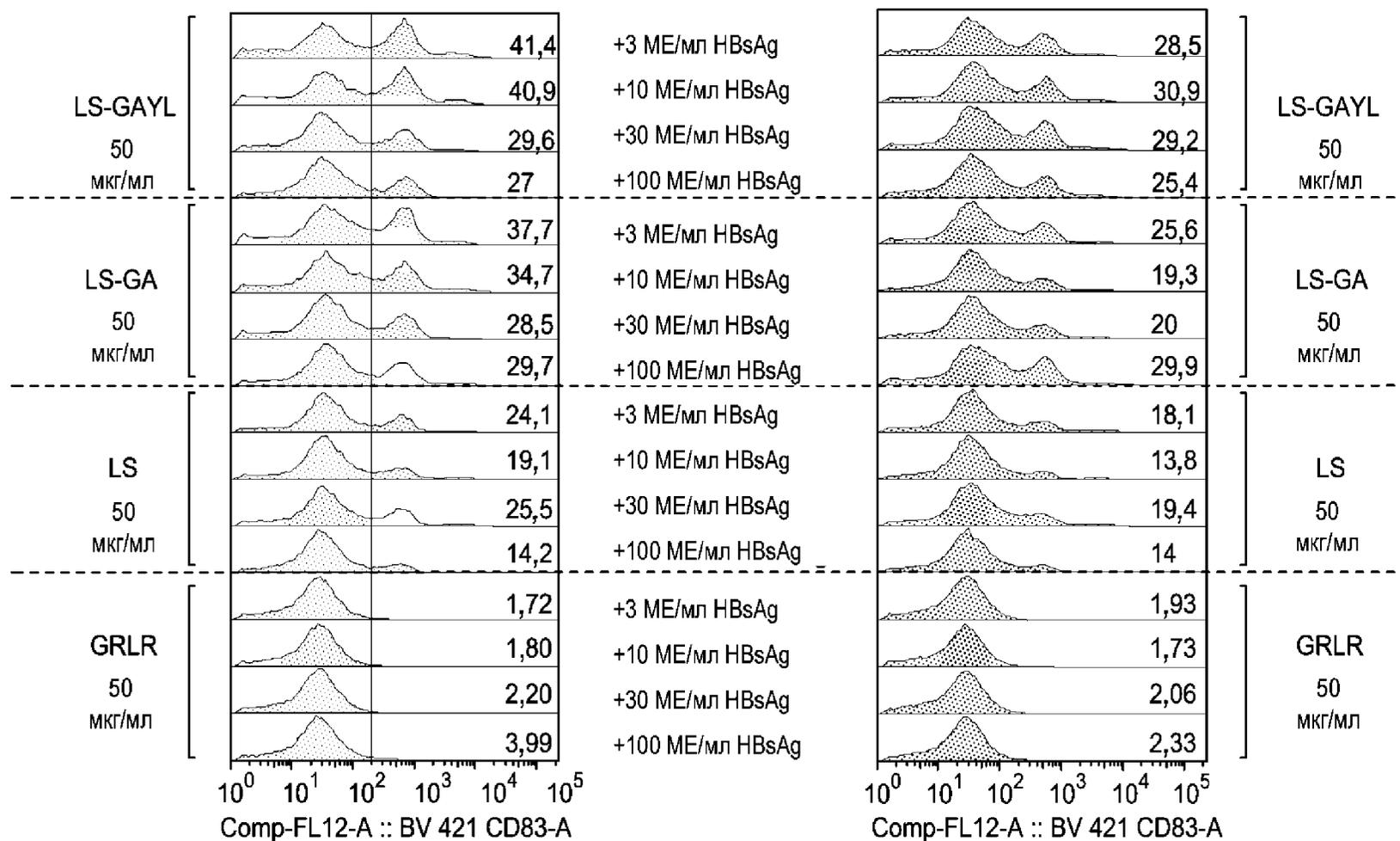


- HBC34-v40-rlgG1-GRLR
- ◐ HBC34-v40-rlgG1-LS
- ◑ HBC34-v40-rlgG1-LS-GAALIE
- ◒ HBC34-v40-rlgG1-LS-GA

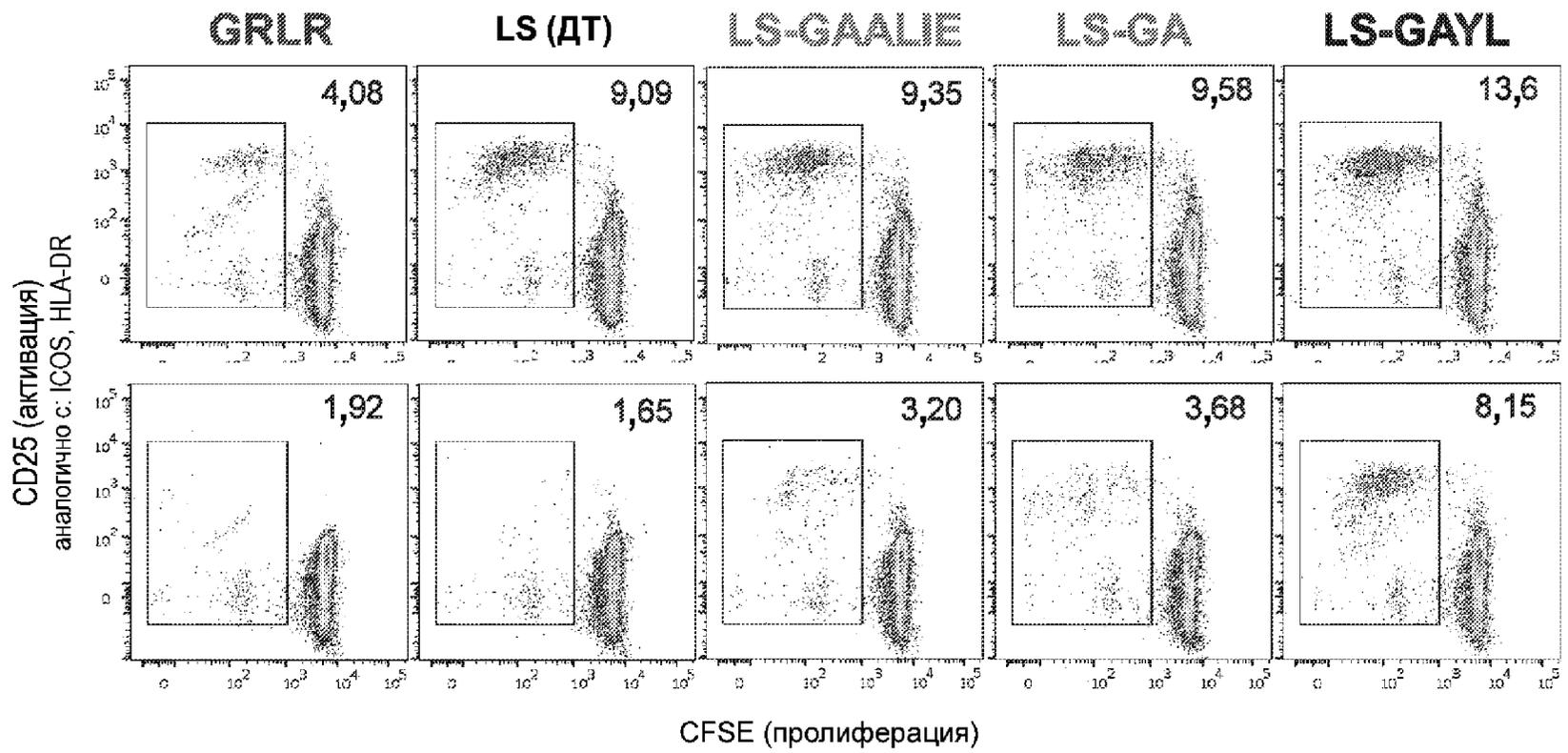
Фиг. 29D



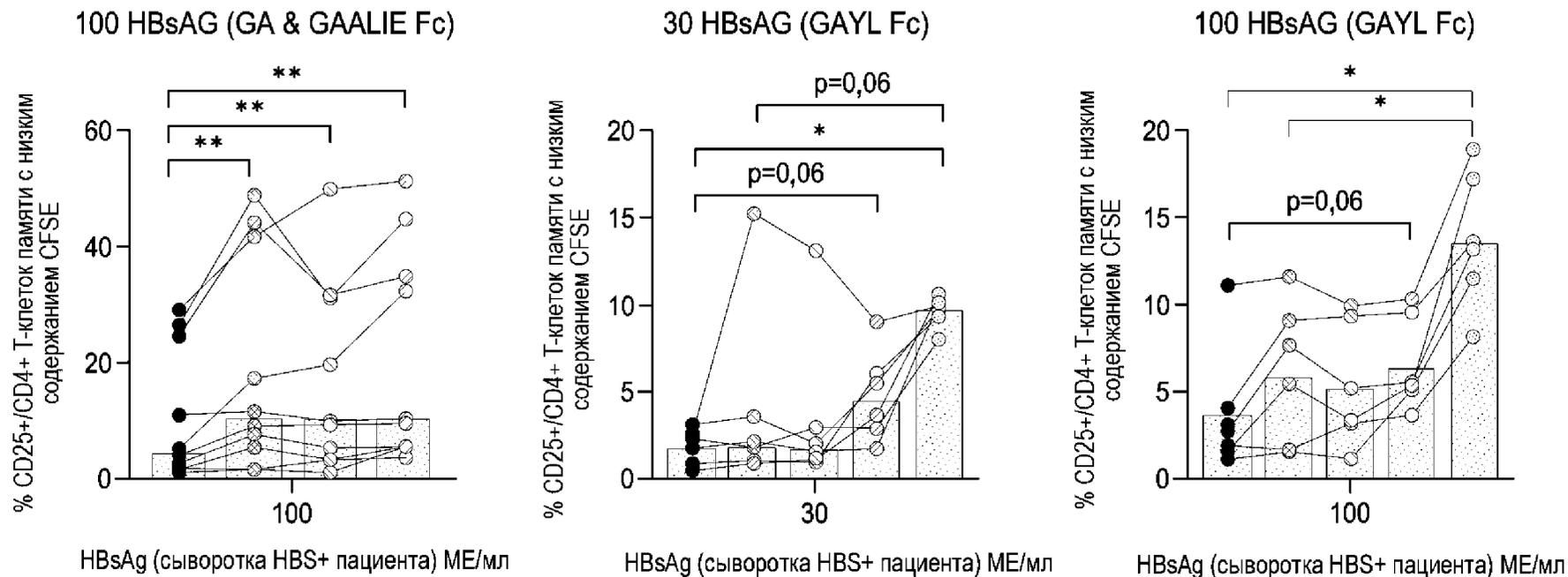
Фиг. 29Е



Фиг. 29F



Фиг. 29G

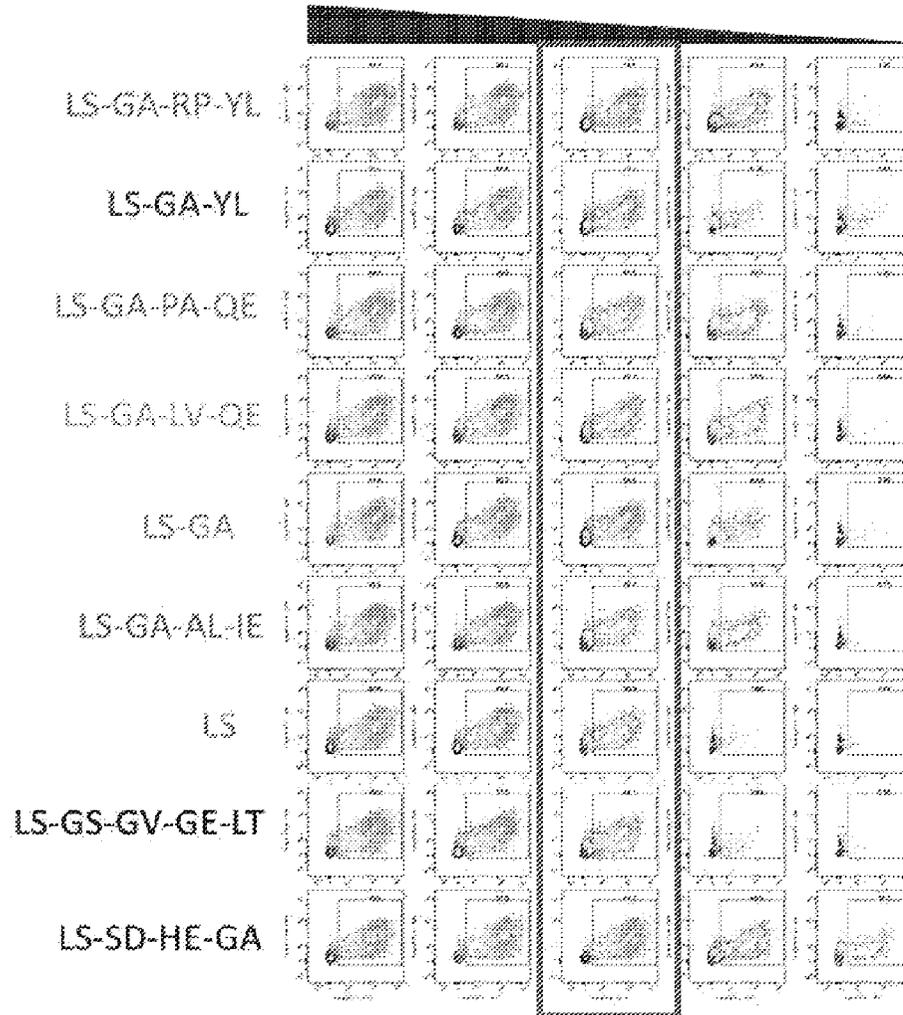


- HBC34-v40-rlgG1-GTLR
- ⊗ HBC34-v40-rlgG1-LS
- HBC34-v40-rlgG1-LS-GAALIE

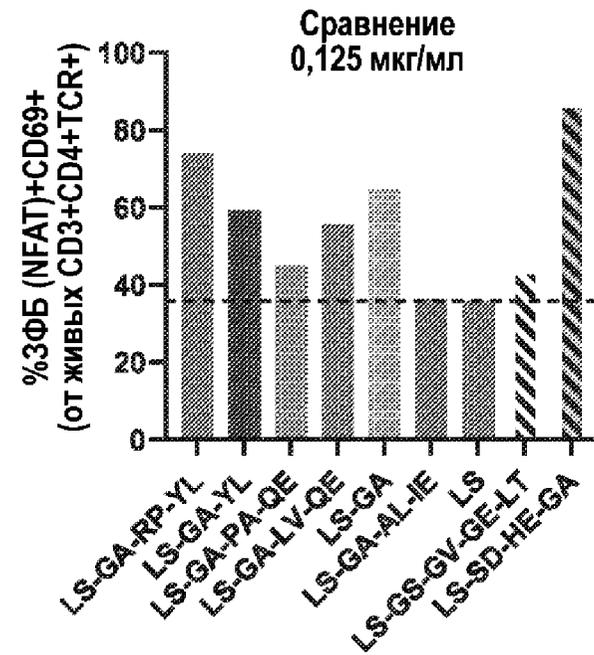
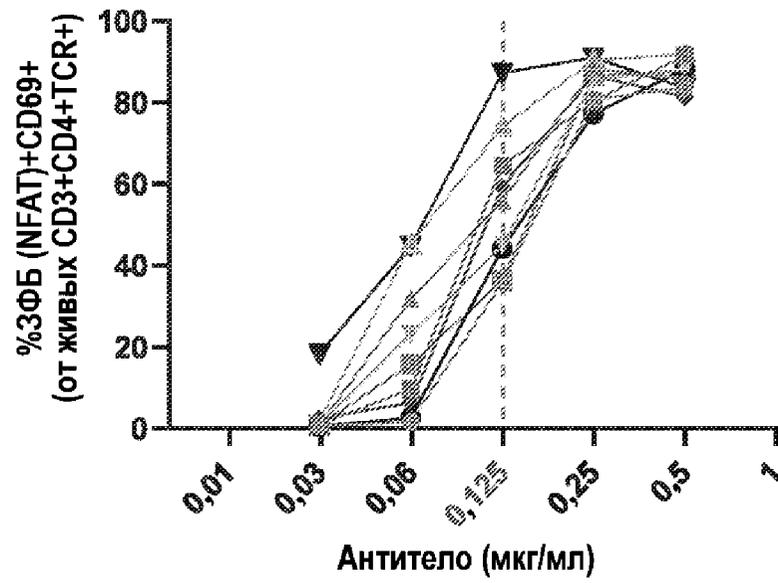
- ⊗ HBC34-v40-rlgG1-LS-GA
- HBC34-v40-rlgG1m3-LS-GAYL

Фиг. 29H

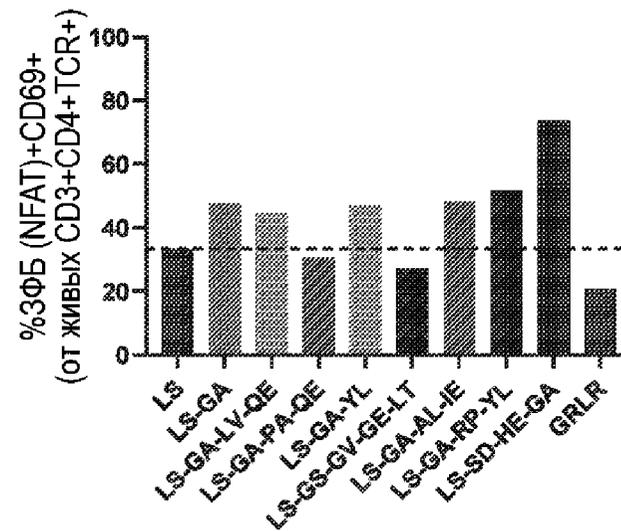
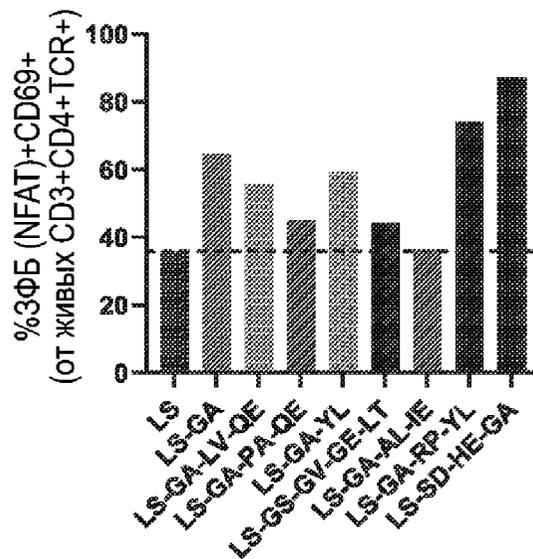
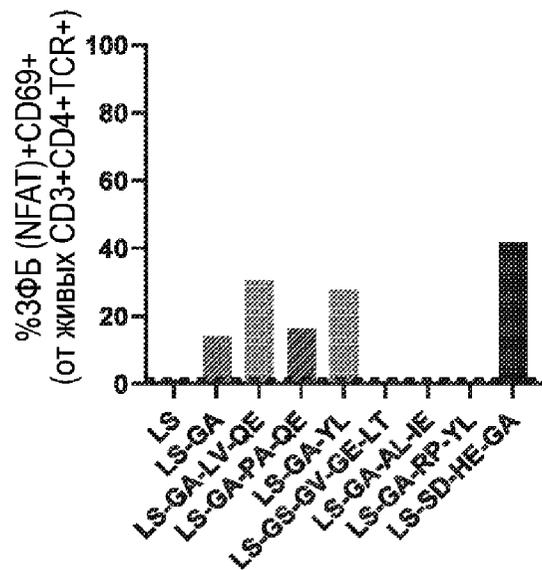
Титрование НВС34 + 1000 МЕ/мл (PLC sup.)



Фиг. 29I



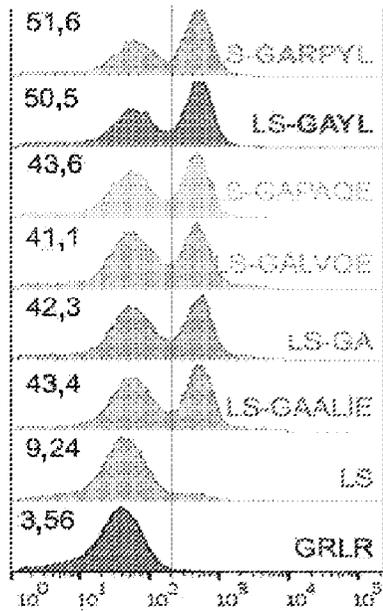
Фиг. 29J



\*сигнал слабее, чем ожидалось

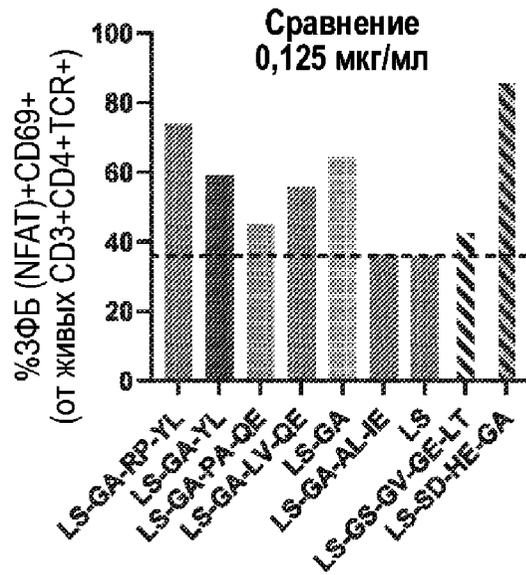
Фиг. 29К

### Активация мДК



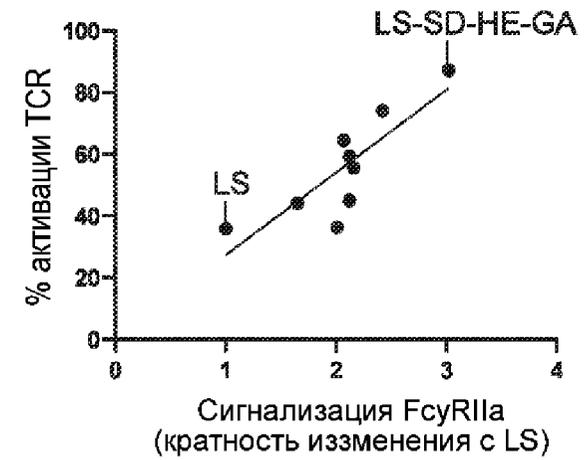
CD83 (аналогично с: CD86  
или цитокинами)  
Донорский FcγRIIA-R/R  
(низкий)

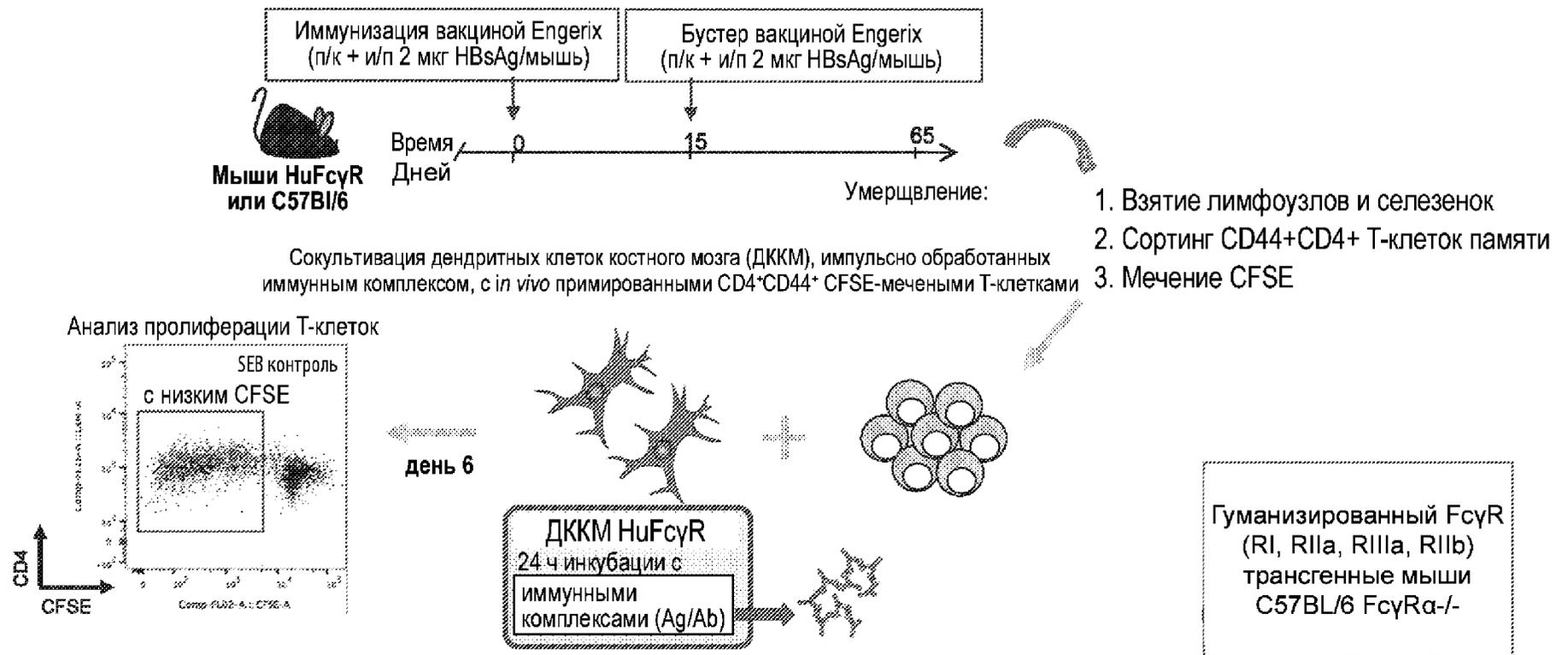
### Активация TCR



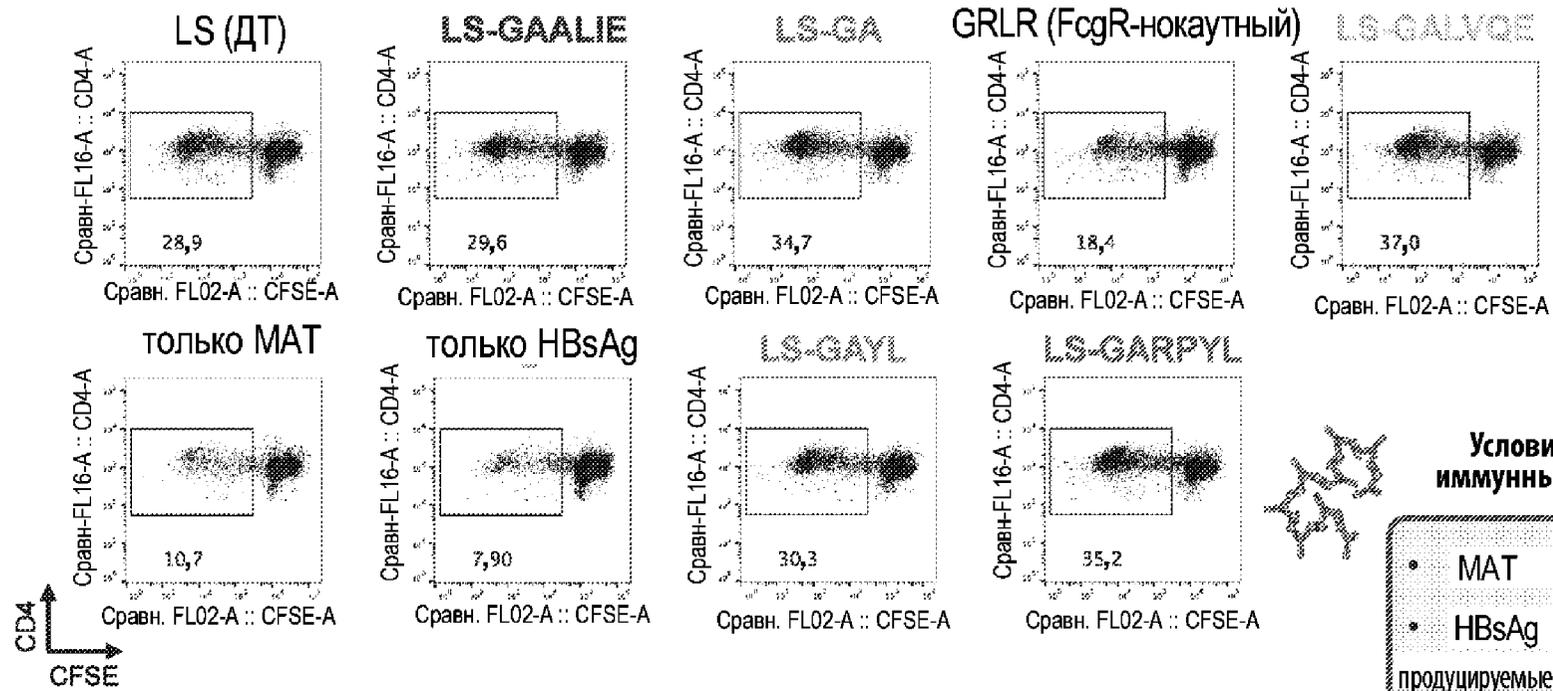
Фиг. 29L

### Сравнение активации TCR и сигнализации FcγRIIa

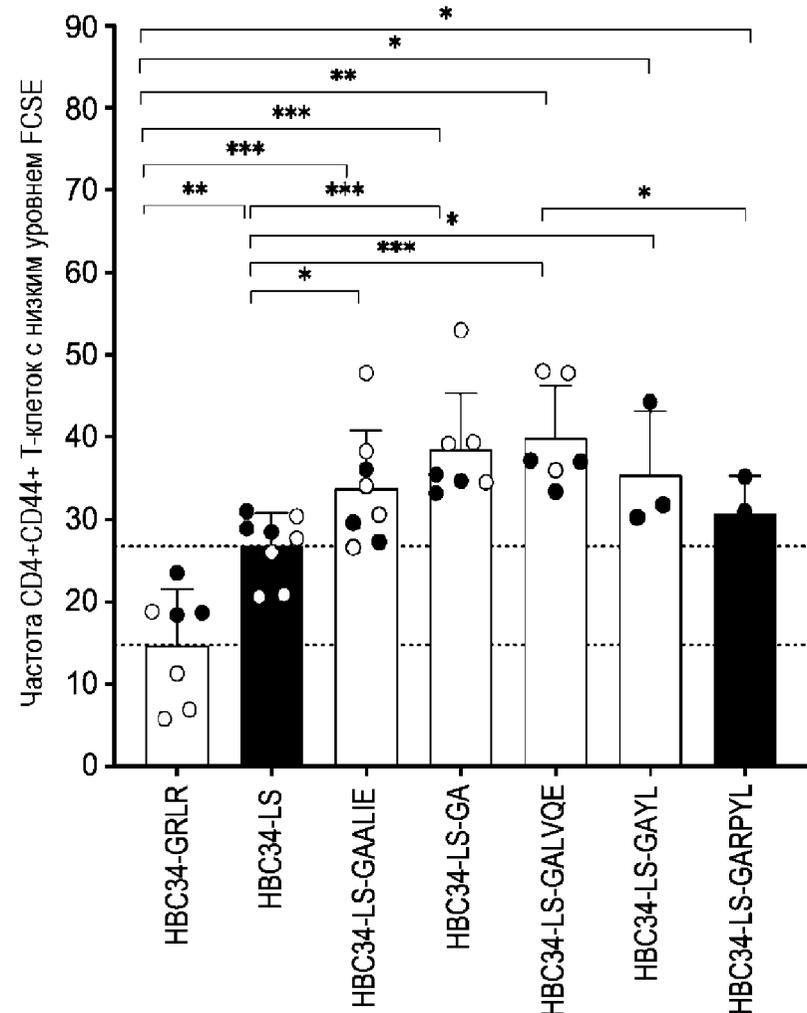
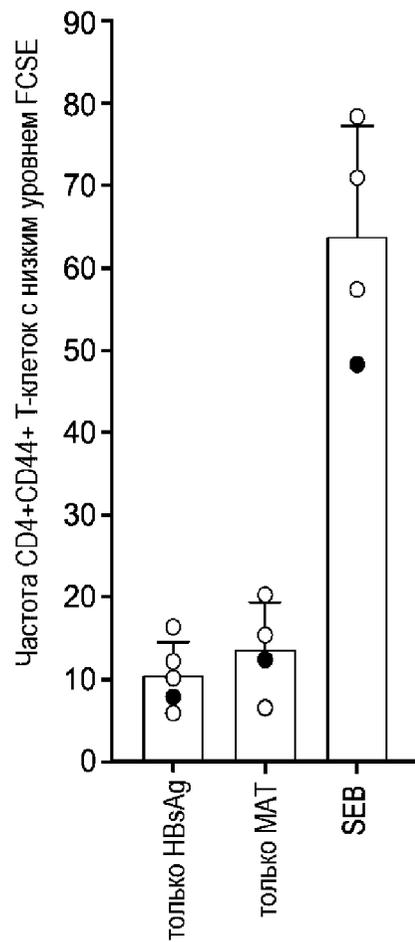




Фиг. 29М



Фиг. 29N



○ Мыши **HuFcγR** в качестве доноров Т-клеток (n=4 независимых эксперимента)

○ Мыши **C57BL/6** в качестве доноров Т-клеток (n=1 эксперимент)

моДК от мышей, трансгенных по **FcγR человека**

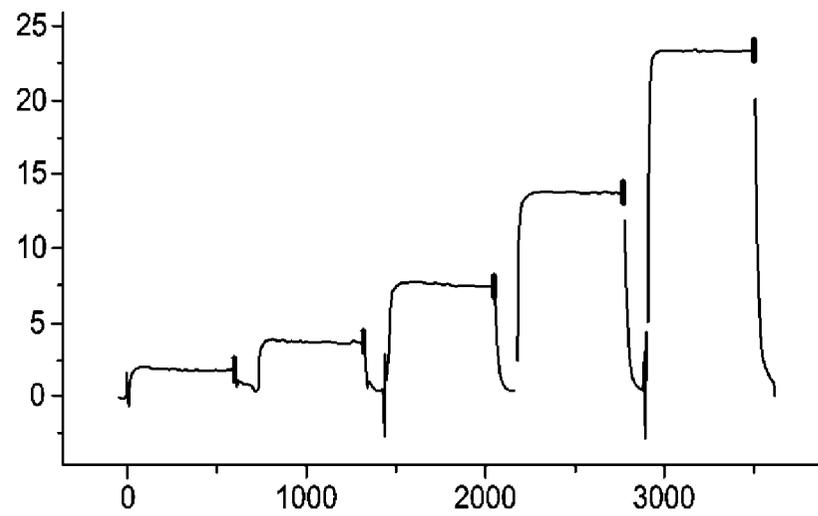
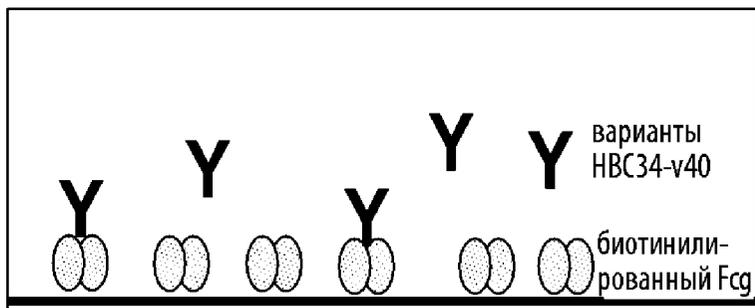


Условия к размеру иммунных комплексов:

- MAT 20 мкг/мл
- HBsAg 1000 ME/мл  
продуцируемые клетками человека (PLC)

(пять независимых экспериментов, 50 тыс. ДККМ + 500 тыс. Т-клеток)

Фиг. 290



Фиг. 29Р

Вариант HBC34-v40	FcgRI FC	FcgRIIa (H) FC	FcgRIIa (R) FC	FcgRIIb FC	FcgRIIIa (V) FC	FcgRIIIa (F) FC
HBC34-v40-rlgG1m3-LS	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
HBC34-v40-rlgG1m3-LS-G236A-L328V-Q295E	0,20	5,17	4,51	1,00	0,31	0,47
HBC34-v40-rlgG1m3-LS-G236A-P230A-Q295E	0,23	5,79	3,01	0,92	0,30	1,62
HBC34-v40-rlgG1m3-LS-G236A-A330L-I332E	1,60	2,87	2,10	0,92	2,60	8,46
HBC34-v40-rlgG1m3-LS-G236A	0,29	5,88	4,54	0,73	0,60	0,99
HBC34-v40-rlgG1m3-LS-G236A-Y300L	0,40	7,73	4,02	0,80	0,51	0,64
HBC34-v40-rlgG1m3-LS-G236A-R292P-Y300L	0,43	7,06	3,67	0,84	2,11	3,14
HBC34-v40-rlgG1m3-LS-afuc	0,80	1,01	1,37	1,27	9,90	9,21
HBC34-v40-rlgG1m3-LS-G236A-R292P-I377N-afuc	0,36	3,37	1,74	0,78	3,22	5,17
HBC34-v40-rlgG1m3-LS-G236A-R292P-Y300L-afuc	0,45	6,25	3,33	0,62	4,46	6,96
HBC34-v40-rlgG1m3-LS-G236A-A330L-I332E-afuc	1,68	2,56	2,08	0,83	22,78	62,86
HBC34-v40-rlgG1m3-LS-G236A-Y300L-afuc	0,31	8,16	2,60	1,34	5,86	4,78
HBC34-v40-rlgG1m3-LS-G236A-afuc	0,24	5,38	3,83	1,31	5,52	5,70
HBC34-v40-rlgG1m3-LS-G236A-L328V-Q295E-afuc	0,30	5,22	5,95	1,13	4,47	4,10
HBC34-v40-rlgG1m3-LS-G236A-R292P-I377N	0,34	3,81	2,12	0,77	0,87	1,40
HBC34-v40-rlgG1m3-LS-G236R-L328R	-	-	-	-	-	-
HBC34-v40-rlgG1m3-LS-G236S-G420V-G446E-L309T	0,09	4,25	1,80	0,69	0,23	0,65
HBC34-v40-rlgG1m3-LS-S239D-H268E-G236A	1,01	9,27	22,56	7,07	4,88	6,76

Фиг. 29Q