

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201990285** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2019.12.30

(22) Дата подачи заявки
2017.09.28

(51) Int. Cl. **C07K 16/00** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **ГЕТЕРОДИМЕРНЫЕ ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫЕ КОНСТРУКЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ**

(31) **201610863814.7**

(32) **2016.09.29**

(33) **CN**

(86) **PCT/CN2017/104044**

(87) **WO 2018/059502 2018.04.05**

(71) Заявитель:

**БЕЙДЖИН ХАНМИ
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД. (CN)**

(72) Изобретатель:

**Лю Цзяван, Сун Нанмэн, Ян Дунгэ,
Ян Япин, Ким Мэнсон (CN)**

(74) Представитель:

**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В. (RU)**

(57) Согласно настоящему изобретению предложен способ получения стабильных и высокоспецифичных гетеродимерных иммуноглобулиновых конструкций, например биспецифичных антител, сохраняющих желаемые свойства нативных IgG без нежелательного ошибочного спаривания тяжелых и легких цепей, которые могут одновременно связываться с двумя молекулами-мишенями и обладают более высокой эффективностью в лечении сложных заболеваний.

A1

201990285

201990285

A1

ГЕТЕРОДИМЕРНЫЕ ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫЕ КОНСТРУКЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

I. ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка притязает на приоритет заявки на патент Китая № CN 2016108638147, поданной 29 сентября 2016 г., описание которой полностью включено сюда посредством ссылки.

II. ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Областью изобретения являются стабильные и высокоспецифичные иммуноглобулиновые конструкции, сохраняющие желаемые свойства нативных антител IgG без нежелательного ошибочного спаривания тяжелых и легких цепей.

III. ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Моноклональные антитела (mAb), обладающие моноспецифичностью и взаимодействующие только с одним эпитопом антигена-мишени, широко применяются для лечения многих заболеваний, включая различные виды рака, воспалительные, аутоиммунные и инфекционные заболевания. Тем не менее, на данный момент ни одна из этих терапевтических молекул не продемонстрировала достаточно высокой эффективности в виде монотерапии, что обусловлено сложной природой таких заболеваний, как рак или воспалительные расстройства, которые обычно опосредованы множеством патогенетических молекулярных путей, а также перекрестным взаимодействием сигнальных каскадов. Поскольку такие mAb взаимодействуют лишь с одним антигеном-мишенью, обеспечение оптимальных терапевтических эффектов затруднено. Одновременная блокада нескольких мишеней или нескольких сайтов одной мишени должна привести к повышению эффективности лечения. Кроме того, целевое воздействие на несколько антигенов/эпитопов одной мультиспецифичной молекулой упрощает разработку новых лекарственных средств, поскольку терапия ограничена одной молекулой. Это также проще для пациентов и медицинских работников в сравнении с применением комбинаций двух или более моноспецифичных молекул.

Биспецифичные антитела (BsAb) или мультиспецифичные молекулы общеизвестны в данной области. Первоначальные попытки получения биспецифичных антител включали химическую конъюгацию двух существующих молекул IgG, двух Fab'- или двух

(Fab')₂-фрагментов с использованием бифункциональных сопрягающих реагентов. Тем не менее, у таких химически конъюгированных BsAb есть свои ограничения, включая трудоемкость получения биспецифичных молекул, трудности очистки гетеродимеров и удаления гомодимеров и исходных моноклональных антител, а также низкий выход.

Другим типом молекул BsAb является гибридная гибридома или квадрома, полученная соматической гибридизацией двух гибридомных клеток, секретирующих разные антитела. Из-за случайного спаривания тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов лишь приблизительно одна десятая часть возможной смеси спаренных IgG содержит функциональные BsAb, что усложняет очистку и снижает выход.

В WO 2013/060867 описан способ крупномасштабного получения гетеродимерных биспецифичных антител восстановлением двух смешиваемых гомодимерных иммуноглобулинов, которое приводит к обмену Fab-фрагментами, усиленному введением асимметричных мутаций в домены CH3 гомодимеров, с последующим обратным окислением межцепочечных дисульфидных связей.

В WO 2009/089004 раскрыт способ получения гетеродимерного белка введением мутации по одной или более чем одной заряженной аминокислоте на линии соприкосновения CH3-CH3, что электростатически препятствует образованию гомодимеров, но электростатически способствует образованию гетеродимеров.

В US 5173168 описан способ получения гетеродимерных IgG с применением метода «выступы во впадины» (“knobs-into-holes”). Сначала создают «выступ» на линии соприкосновения доменов CH3 первой цепи посредством замены аминокислоты с меньшей боковой цепью на аминокислоту с большей боковой цепью и «впадину» на линии соприкосновения доменов CH3 второй цепи посредством замены аминокислоты с большей боковой цепью на аминокислоту с меньшей боковой цепью. Взаимодействие «выступа и впадины» способствует образованию гетеродимерных IgG и препятствует образованию гомодимеров.

В WO 2012/058768 раскрыт способ получения гетеродимерного IgG в результате мутаций, введенных в домен CH3 IgG1, включая отрицательный и положительный дизайн, а также методики конструирования белков на основе структурного и компьютерного моделирования.

Неонатальный Fc-рецептор, FcRn, содержит одну трансмембранную тяжелую цепь (субъединица P51, α-цепь) и одну растворимую легкую цепь (субъединица P14, β-цепь), удерживаемые друг рядом с другом нековалентными взаимодействиями, и по структуре гомологичен семейству гетеродимерных рецепторов главного комплекса

гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) класса I. FcRn выполняет ряд важных биологических функций. В качестве рецептора-переносчика FcRn связывается с IgG и альбумином и проникает через множество клеточных барьеров. Например, FcRn осуществляет перенос материнских антител IgG плоду, обеспечивая неонатальный гуморальный иммунитет во время беременности. pH-зависимое взаимодействие FcRn с IgG и альбумином критически важно для увеличения периода полувыведения из сыворотки посредством рециркуляции и меньшей деградации белка, как раскрыто в Adv Drug Deliv Rev. 2015 Aug 30; 91:109-24; J Immunol. 2015 May 15; 194 (10):4595-603; и Nat Rev Immunol. 2007 Sep; 7(9):715-25. Сайт связывания FcRn и IgG расположен на линии соприкосновения доменов CH2 и CH3 и включает аминокислотные остатки 253, 310 и 435, как раскрыто в Immunol Rev. 2015 Nov; 268(1):253-68 и Mol Immunol. 2015 Oct; 67(2 Pt A):131-41.

IV. КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к гетеродимерным иммуноглобулиновым конструкциям, например, биспецифичным антителам, имеющим модифицированные константные области, что повышает стабильность и специфичность, а также к способам их получения и применения.

Соответственно, в первом аспекте, настоящее изобретение направлено на гетеродимер, содержащий элемент, связывающийся с Fc-рецептором (FcR), и одну или более чем одну распознающую группировку, ковалентно связанную с элементом, связывающимся с FcR. Элемент, связывающийся с FcR, содержит первый полипептид и второй полипептид, соединенные друг с другом одной или более чем одной дисульфидной связью. Каждый из первого полипептида и второго полипептида содержит по меньшей мере часть константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Первый полипептид и второй полипептид содержат по меньшей мере пять аминокислотных замен в следующих положениях:

- 1) 366 и 399 в первом полипептиде и 351, 407 и 409 во втором полипептиде; или
- 2) 366 и 409 в первом полипептиде и 351, 399 и 407 во втором полипептиде;

благодаря чему первый и второй полипептиды имеют более высокую склонность к димеризации друг с другом, чем сами с собой.

В некоторых воплощениях по меньшей мере пять аминокислотных замен включают по меньшей мере одну из следующих замен:

- а) глицин, тирозин, валин, пролин, аспаргат, глутамат, лизин или триптофан вместо L351 во втором полипептиде;

- b) лейцин, пролин, триптофан или валин вместо T366 в первом полипептиде;
- c) цистеин, аспарагин, изолейцин, глицин, аргинин, треонин или аланин вместо D399 в первом полипептиде и/или втором полипептиде;
- d) лейцин, аланин, пролин, фенилаланин, треонин или гистидин вместо Y407 во втором полипептиде; и
- e) цистеин, пролин, серин, фенилаланин, валин, глутамат или аргинин вместо K409 в первом полипептиде и/или втором полипептиде.

В некоторых воплощениях по меньшей мере пять аминокислотных замен включают любую из следующих комбинаций любого элемента каждой из группы I(a)-(h) и группы II(a)-(h):

группа I:

- a) T366L в первом полипептиде и L351E, Y407L во втором полипептиде;
- b) T366L в первом полипептиде и L351G, Y407L во втором полипептиде;
- c) T366L в первом полипептиде и L351Y, Y407A во втором полипептиде;
- d) T366P в первом полипептиде и L351V, Y407P во втором полипептиде;
- e) T366W в первом полипептиде и L351D, Y407P во втором полипептиде;
- f) T366P в первом полипептиде и L351P, Y407F во втором полипептиде;
- g) T366V в первом полипептиде и L351K, Y407T во втором полипептиде; и
- h) T366L в первом полипептиде и L351W, Y407H во втором полипептиде;

группа II:

- a) D399R в первом полипептиде и K409V во втором полипептиде;
- b) D399C в первом полипептиде и K409C во втором полипептиде;
- c) D399C в первом полипептиде и K409P во втором полипептиде;
- d) D399N в первом полипептиде и K409S во втором полипептиде;
- e) D399G в первом полипептиде и K409S во втором полипептиде;
- f) D399I в первом полипептиде и K409F во втором полипептиде;
- g) D399T в первом полипептиде и K409Q во втором полипептиде; и
- h) D399A в первом полипептиде и K409R во втором полипептиде.

В некоторых воплощениях по меньшей мере пять аминокислотных замен включают любую из следующих комбинаций любого элемента каждой из группы III(a)-(h) и группы IV(a)-(h):

группа III:

- a) T366L в первом полипептиде и L351E, Y407L во втором полипептиде;
- b) T366L в первом полипептиде и L351G, Y407L во втором полипептиде;

- c) T366L в первом полипептиде и L351Y, Y407A во втором полипептиде;
 - d) T366P в первом полипептиде и L351V, Y407P во втором полипептиде;
 - e) T66W в первом полипептиде и L351D, Y407P во втором полипептиде;
 - f) T366P в первом полипептиде и L351P, Y407F во втором полипептиде;
 - g) T366V в первом полипептиде и L351K, Y407T во втором полипептиде; и
 - h) T366L в первом полипептиде и L351W, Y407H во втором полипептиде;
- группа IV:

- a) K409V в первом полипептиде и D399R во втором полипептиде;
- b) K409C в первом полипептиде и D399C во втором полипептиде;
- c) K409P в первом полипептиде и D399C во втором полипептиде;
- d) K409S в первом полипептиде и D399N во втором полипептиде;
- e) K409S в первом полипептиде и D399G во втором полипептиде;
- f) K409F в первом полипептиде и D399I во втором полипептиде;
- g) K409Q в первом полипептиде и D399T во втором полипептиде; и
- h) K409R в первом полипептиде и D399A во втором полипептиде.

В некоторых воплощениях по меньшей мере пять аминокислотных замен включают любой из следующих элементов группы V(a)-(h):

группа V:

- a) T366L и D399R в первом полипептиде и L351E, Y407L и K409V во втором полипептиде;
- b) T366L и D399C в первом полипептиде и L351G, Y407L и K409C во втором полипептиде;
- c) T366L и D399C в первом полипептиде и L351Y, Y407A и K409P во втором полипептиде;
- d) T366P и D399N в первом полипептиде и L351V, Y407P и K409S во втором полипептиде;
- e) T366W и D399G в первом полипептиде и L351D, Y407P и K409S во втором полипептиде;
- f) T366P и D399I в первом полипептиде и L351P, Y407F и K409F во втором полипептиде;
- g) T366V и D399T в первом полипептиде и L351K, Y407T и K409Q во втором полипептиде; и
- h) T366L и D399A в первом полипептиде и L351W, Y407H и K409R во втором полипептиде.

В некоторых воплощениях по меньшей мере пять аминокислотных замен включают любой из следующих элементов группы VI(a)-(h):

группа VI:

a) T366L и K409V в первом полипептиде и L351E, Y407L и D399R во втором полипептиде;

b) T366L и K409C в первом полипептиде и L351G, Y407L и D399C во втором полипептиде;

c) T366L и K409P в первом полипептиде и L351Y, Y407A и D399C во втором полипептиде;

d) T366P и K409S в первом полипептиде и L351V, Y407P и D399N во втором полипептиде;

e) T366W и K409S в первом полипептиде и L351D, Y407P и D399G во втором полипептиде;

f) T366P и K409F в первом полипептиде и L351P, Y407F и D399I во втором полипептиде;

g) T366V и K409Q в первом полипептиде и L351K, Y407T и D399T во втором полипептиде; и

h) T366L и K409R в первом полипептиде и L351W, Y407H и D399A во втором полипептиде.

В некоторых воплощениях по меньшей мере пять аминокислотных замен включают T366L и D399R в первом полипептиде. В некоторых воплощениях по меньшей мере пять аминокислотных замен включают L351E, Y407L и K409V во втором полипептиде. В некоторых воплощениях по меньшей мере пять аминокислотных замен включают T366L и D399R в первом полипептиде и L351E, Y407L и K409V во втором полипептиде.

В некоторых воплощениях элемент, связывающийся с FcR, содержит Fc-домен. В некоторых воплощениях Fc-домен имеет происхождение от Fc-домена IgG. В некоторых воплощениях Fc-домен имеет происхождение от одного из Fc-домена IgG1, Fc-домена IgG2, Fc-домена IgG3 и Fc-домена IgG4.

В некоторых воплощениях элемент, связывающийся с FcR, способен специфично связываться с Fc-рецептором. В некоторых воплощениях Fc-рецептор представляет собой неонатальный Fc-рецептор (FcRn). В некоторых воплощениях Fc-рецептор представляет собой одно из FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB1, FcγRIIB2, FcγRIIA, FcγRIIB, FcεRI, FcεRII, FcαRI, Fcα/μR, FcRn и их комбинаций. В некоторых воплощениях связывание с

Fc-рецептором запускает антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC).

В некоторых воплощениях последовательность по меньшей мере одного из первого полипептида и второго полипептида содержит одну из SEQ ID NO:16-31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 48, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 68, 69, 70 и 71.

В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка, ковалентно связанная с элементом, связывающимся с FcR, содержит по меньшей мере одно из антигенсвязывающего (Fab) фрагмента или фрагментов, одноцепочечного переменного фрагмента или фрагментов (scFv), внеклеточных доменов мембранных рецепторов, пептидных лигандов клеточных мембранных рецепторов, цитокинов и аффинных меток. В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка содержит Fab-фрагмент и scFv-фрагмент. В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка содержит два scFv-фрагмента. В некоторых воплощениях два scFv-фрагмента неидентичны. В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка содержит два Fab-фрагмента. В некоторых воплощениях два Fab-фрагмента неидентичны. В некоторых воплощениях гетеродимеры содержат иммуноглобулиноподобные (Ig-подобные) молекулы, имеющие два неидентичных Fab-фрагмента.

В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка распознает HER2. В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка распознает PD-L1. В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка распознает Троп-2. В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка распознает CD3. В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка распознает CD20.

В некоторых воплощениях распознавание включает специфичное связывание. В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка специфично связывается с HER2. В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка специфично связывается с PD-L1. В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка специфично связывается с Троп-2. В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка специфично связывается с CD3. В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка специфично связывается с CD20.

В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка содержит пару распознающих группировок, выбранную из группы VII(a)-(d) ниже:

группа VII:

- a) Fab, специфично связывающийся с HER2, и scFv, специфично связывающийся с CD3;
- b) Fab, специфично связывающийся с Trop-2, и scFv, специфично связывающийся с CD3;
- c) Fab, специфично связывающийся с CD20, и scFv, специфично связывающийся с CD3; и
- d) Fab, специфично связывающийся с PD-L1, и scFv, специфично связывающийся с CD3.

В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка содержит Fab, специфично связывающийся с HER2, и Fab, специфично связывающийся с CD20.

В некоторых воплощениях гетеродимеры содержат неидентичные первые тяжелые цепи, неидентичные вторые тяжелые цепи, неидентичные первые легкие цепи и неидентичные вторые легкие цепи.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на способ получения гетеродимера. В некоторых воплощениях способ включает следующие стадии: 1) экспрессию одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей первый полипептид, в первой клетке-хозяине и одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей второй полипептид, во второй клетке-хозяине, где первая клетка-хозяин и вторая клетка-хозяин отделены друг от друга; 2) восстановление первого полипептида и второго полипептида, когда они разделены; 3) смешивание первого полипептида и второго полипептида с получением смеси; 4) окисление полученной смеси; и 5) выделение образованного гетеродимера.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на способ получения гетеродимера, содержащего бивалентный гетерологичный иммуноглобулин, имеющий неидентичные первую тяжелую цепь и вторую тяжелую цепь и неидентичные первую легкую цепь и вторую легкую цепь. В некоторых воплощениях способ включает следующие стадии: 1) экспрессию одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, в первой клетке-хозяине и одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, во второй клетке-хозяине, где первая клетка-хозяин и вторая клетка-хозяин отделены друг от друга; 2) восстановление первой тяжелой цепи и первой легкой цепи совместно и второй тяжелой цепи и второй легкой цепи совместно; 3) объединение

первой тяжелой цепи, первой легкой цепи, второй тяжелой цепи и второй легкой цепи с получением смеси; 4) окисление полученной смеси; и 5) выделение образованного гетеродимера. В некоторых воплощениях первая тяжелая цепь и вторая тяжелая цепь образуют Fc-область бивалентного гетерологичного иммуноглобулина.

В некоторых воплощениях Fc-область содержит по меньшей мере пять аминокислотных замен, включающих любую из следующих комбинаций любого элемента каждой из группы VIII(a)-(h) и группы IX(a)-(h):

группа VIII:

- a) T366L в первой тяжелой цепи и L351E, Y407L во второй тяжелой цепи;
- b) T366L в первой тяжелой цепи и L351G, Y407L во второй тяжелой цепи;
- c) T366L в первой тяжелой цепи и L351Y, Y407A во второй тяжелой цепи;
- d) T366P в первой тяжелой цепи и L351V, Y407P во второй тяжелой цепи;
- e) T366W в первой тяжелой цепи и L351D, Y407P во второй тяжелой цепи;
- f) T366P в первой тяжелой цепи и L351P, Y407F во второй тяжелой цепи;
- g) T366V в первой тяжелой цепи и L351K, Y407T во второй тяжелой цепи; и
- h) T366L в первой тяжелой цепи и L351W, Y407H во второй тяжелой цепи;

группа IX:

- a) D399R в первой тяжелой цепи и K409V во второй тяжелой цепи;
- b) D399C в первой тяжелой цепи и K409C во второй тяжелой цепи;
- c) D399C в первой тяжелой цепи и K409P во второй тяжелой цепи;
- d) D399N в первой тяжелой цепи и K409S во второй тяжелой цепи;
- e) D399G в первой тяжелой цепи и K409S во второй тяжелой цепи;
- f) D399I в первой тяжелой цепи и K409F во второй тяжелой цепи;
- g) D399T в первой тяжелой цепи и K409Q во второй тяжелой цепи; и
- h) D399A в первой тяжелой цепи и K409R во второй тяжелой цепи.

В некоторых воплощениях по меньшей мере пять аминокислотных замен включают любой из следующих элементов группы X(a)-(h):

группа X:

- a) T366L и D399R в первой тяжелой цепи и L351E, Y407L и K409V во второй тяжелой цепи;
- b) T366L и D399C в первой тяжелой цепи и L351G, Y407L и K409C во второй тяжелой цепи;
- c) T366L и D399C в первой тяжелой цепи и L351Y, Y407A и K409P во второй тяжелой цепи;

d) T366P и D399N в первой тяжелой цепи и L351V, Y407P и K409S во второй тяжелой цепи;

e) T366W и D399G в первом полипептиде и L351D, Y407P и K409S во второй тяжелой цепи;

f) T366P и D399I в первом полипептиде и L351P, Y407F и K409F во второй тяжелой цепи;

g) T366V и D399T в первой тяжелой цепи и L351K, Y407T и K409Q во второй тяжелой цепи; и

h) T366L и D399A в первой тяжелой цепи и L351W, Y407H и K409R во второй тяжелой цепи.

В некоторых воплощениях по меньшей мере пять аминокислотных замен включают любой из следующих элементов группы XI(a)-(h):

группа XI:

a) T366L и K409V в первой тяжелой цепи и L351E, Y407L и D399R во второй тяжелой цепи;

b) T366L и K409C в первой тяжелой цепи и L351G, Y407L и D399C во второй тяжелой цепи;

c) T366L и K409P в первой тяжелой цепи и L351Y, Y407A и D399C во второй тяжелой цепи;

d) T366P и K409S в первой тяжелой цепи и L351V, Y407P и D399N во второй тяжелой цепи;

e) T366W и K409S в первой тяжелой цепи и L351D, Y407P и D399G во второй тяжелой цепи;

f) T366P и K409F в первой тяжелой цепи и L351P, Y407F и D399I во второй тяжелой цепи;

g) T366V и K409Q в первой тяжелой цепи и L351K, Y407T и D399T во второй тяжелой цепи; и

h) T366L и K409R в первой тяжелой цепи и L351W, Y407H и D399A во второй тяжелой цепи.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на способ получения гетеродимера, содержащего иммуноглобулиновый гетеродимер, содержащий неидентичные первую тяжелую цепь и вторую тяжелую цепь и неидентичные первую легкую цепь и вторую легкую цепь. В некоторых воплощениях способ включает следующие стадии: 1) экспрессию одной или более чем одной нуклеиновой кислоты,

кодирующей первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, в первой клетке-хозяине и одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, во второй клетке-хозяине, где первая клетка-хозяин и вторая клетка-хозяин отделены друг от друга; 2) восстановление первой тяжелой цепи и первой легкой цепи совместно и второй тяжелой цепи и второй легкой цепи совместно; 3) объединение первой тяжелой цепи, первой легкой цепи, второй тяжелой цепи и второй легкой цепи с получением смеси; 4) окисление полученной смеси; и 5) выделение образованного гетеродимера. В некоторых воплощениях первая тяжелая цепь и вторая тяжелая цепь образуют Fc-область бивалентного гетерологичного иммуноглобулина.

В некоторых воплощениях Fc-домен содержит по меньшей мере пять аминокислотных замен, включающих любую из следующих комбинаций любого элемента каждой из группы XII(a)-(h) и группы XIII(a)-(h):

группа XII:

- a) T366L в первой тяжелой цепи и L351E, Y407L во второй тяжелой цепи;
- b) T366L в первой тяжелой цепи и L351G, Y407L во второй тяжелой цепи;
- c) T366L в первой тяжелой цепи и L351Y, Y407A во второй тяжелой цепи;
- d) T366P в первой тяжелой цепи и L351V, Y407P во второй тяжелой цепи;
- e) T366W в первой тяжелой цепи и L351D, Y407P во второй тяжелой цепи;
- f) T366P в первой тяжелой цепи и L351P, Y407F во второй тяжелой цепи;
- g) T366V в первой тяжелой цепи и L351K, Y407T во второй тяжелой цепи; и
- h) T366L в первой тяжелой цепи и L351W, Y407H во второй тяжелой цепи;

группа XIII:

- a) K409V в первой тяжелой цепи и D399R во второй тяжелой цепи;
- b) K409C в первой тяжелой цепи и D399C во второй тяжелой цепи;
- c) K409P в первой тяжелой цепи и D399C во второй тяжелой цепи;
- d) K409S в первой тяжелой цепи и D399N во второй тяжелой цепи;
- e) K409S в первой тяжелой цепи и D399G во второй тяжелой цепи;
- f) K409F в первой тяжелой цепи и D399I во второй тяжелой цепи;
- g) K409Q в первой тяжелой цепи и D399T во второй тяжелой цепи; и
- h) K409R в первой тяжелой цепи и D399A во второй тяжелой цепи.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на способ получения гетеродимера, содержащего бивалентный гетерологичный белок, содержащий тяжелую цепь, легкую цепь и scFv-фрагмент, связанный с Fc-цепью, где часть тяжелой цепи и Fc-цепи, связанной с scFv-фрагментом, образуют Fc-область. В некоторых воплощениях

способ включает следующие стадии: 1) экспрессию одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь и легкую цепь, и одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей scFv-фрагмент, связанный с Fc-цепью, в клетке-хозяине; и 2) выделение образованного гетеродимера.

В некоторых воплощениях Fc-область содержит по меньшей мере пять аминокислотных замен, включающих любую из следующих комбинаций любого элемента каждой из группы XIV(a)-(h) и группы XV(a)-(h):

группа XIV:

- a) T366L в первой тяжелой цепи и L351E, Y407L во второй тяжелой цепи;
- b) T366L в первой тяжелой цепи и L351G, Y407L во второй тяжелой цепи;
- c) T366L в первой тяжелой цепи и L351Y, Y407A во второй тяжелой цепи;
- d) T366P в первой тяжелой цепи и L351V, Y407P во второй тяжелой цепи;
- e) T366W в первой тяжелой цепи и L351D, Y407P во второй тяжелой цепи;
- f) T366P в первой тяжелой цепи и L351P, Y407F во второй тяжелой цепи;
- g) T366V в первой тяжелой цепи и L351K, Y407T во второй тяжелой цепи; и
- h) T366L в первой тяжелой цепи и L351W, Y407H во второй тяжелой цепи;

группа XV:

- a) D399R в первой тяжелой цепи и K409V во второй тяжелой цепи;
- b) D399C в первой тяжелой цепи и K409C во второй тяжелой цепи;
- c) D399C в первой тяжелой цепи и K409P во второй тяжелой цепи;
- d) D399N в первой тяжелой цепи и K409S во второй тяжелой цепи;
- e) D399G в первой тяжелой цепи и K409S во второй тяжелой цепи;
- f) D399I в первой тяжелой цепи и K409F во второй тяжелой цепи;
- g) D399T в первой тяжелой цепи и K409Q во второй тяжелой цепи; и
- h) D399A в первой тяжелой цепи и K409R во второй тяжелой цепи.

В некоторых воплощениях по меньшей мере пять аминокислотных замен включают любую из следующих комбинаций любого элемента каждой из группы XVI(a)-(h) и группы XVII(a)-(h):

группа XVI:

- a) T366L в первой тяжелой цепи и L351E, Y407L во второй тяжелой цепи;
- b) T366L в первой тяжелой цепи и L351G, Y407L во второй тяжелой цепи;
- c) T366L в первой тяжелой цепи и L351Y, Y407A во второй тяжелой цепи;
- d) T366P в первой тяжелой цепи и L351V, Y407P во второй тяжелой цепи;
- e) T366W в первой тяжелой цепи и L351D, Y407P во второй тяжелой цепи;

- f) T366P в первой тяжелой цепи и L351P, Y407F во второй тяжелой цепи;
 - g) T366V в первой тяжелой цепи и L351K, Y407T во второй тяжелой цепи; или
 - h) T366L в первой тяжелой цепи и L351W, Y407H во второй тяжелой цепи;
- группа XVII:

- a) K409V в первой тяжелой цепи и D399R во второй тяжелой цепи;
- b) K409C в первой тяжелой цепи и D399C во второй тяжелой цепи;
- c) K409P в первой тяжелой цепи и D399C во второй тяжелой цепи;
- d) K409S в первой тяжелой цепи и D399N во второй тяжелой цепи;
- e) K409S в первой тяжелой цепи и D399G во второй тяжелой цепи;
- f) K409F в первой тяжелой цепи и D399I во второй тяжелой цепи;
- g) K409Q в первой тяжелой цепи и D399T во второй тяжелой цепи; и
- h) K409R в первой тяжелой цепи и D399A во второй тяжелой цепи.

В некоторых воплощениях аспектов, относящихся к способам получения гетеродимера, нуклеиновые кислоты расположены на векторе или в системе векторов. В некоторых воплощениях вектор или система векторов включает плазмидный вектор (векторы) pX0GC, полученный модификацией вектора (векторов) pCDNA.

В некоторых воплощениях аспектов, относящихся к способам получения гетеродимера, клетки-хозяева включают клетки эмбриональной почки человека (HEK293) или HEK293T, HEK293E, HEK293F, полученные модификацией клеток HEK293, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или CHO-S, CHO-dhfr⁻, CHO/DG44, ExpiCHO, полученные модификацией клеток CHO, и их комбинации.

В некоторых воплощениях аспектов, относящихся к способам получения гетеродимера, стадии, включающие восстановление, включают один или более чем один восстановитель, содержащий по меньшей мере одно из 2-аминоэтантола, дитиотреитола, гидрохлорида трис(2-карбоксиил)фосфина, их химических производных и их комбинаций. В некоторых воплощениях способы дополнительно включают восстановление при приблизительно 2-8°C, например, 3-6°C и 4°C, возможно, на протяжении периода времени продолжительностью по меньшей мере приблизительно 3 часа (например, 3-8 часов, 4-7 часов и 5-6 часов). В других воплощениях способы включают удаление одного или более чем одного восстановителя. В некоторых воплощениях удаление одного или более чем одного восстановителя включает метод обессоливания.

В некоторых воплощениях аспектов, относящихся к способам получения гетеродимера, стадии, включающие окисление, включают один или более чем один

окислитель, содержащий по меньшей мере одно из L-дегидроаскорбиновой кислоты, ее химических производных и их комбинаций. В некоторых воплощениях способы дополнительно включают окисление при приблизительно 2-8°C, например, 3-6°C и 4°C, возможно, на протяжении периода времени продолжительностью по меньшей мере приблизительно 5 часов (например, от 5 часов до 4 суток, от 5 часов до 3 суток, от 5 часов до 1 суток). В некоторых воплощениях способ дополнительно включает выделение и/или очистку.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на нуклеиновые кислоты, кодирующие часть гетеродимера по любому аспекту настоящего изобретения. В некоторых воплощениях последовательность нуклеиновой кислоты содержит одну из SEQ ID NO:32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 47, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62 и 64-67, или последовательность, по меньшей мере на 70%, например, по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или по меньшей мере на 99,9%, идентичную одной или более из SEQ ID NO:32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 47, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62 и 64-67. В некоторых воплощениях последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, которая будет гибридизоваться с одной или более из SEQ ID NO:32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 47, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62 и 64-67 в жестких условиях. В некоторых воплощениях последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, комплементарную одной или более из SEQ ID NO:32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 47, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62 и 64-67.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на вектор или систему векторов, содержащую по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, кодирующую часть гетеродимера по любому аспекту настоящего изобретения. В некоторых воплощениях вектор или система векторов включает плазмидный вектор (векторы) pX0GC, полученный модификацией вектора (векторов) pCDNA.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на клетку-хозяина, содержащую вектор или систему векторов, содержащую любую нуклеиновую кислоту, кодирующую часть гетеродимера по любому аспекту настоящего изобретения. В некоторых воплощениях клетка-хозяин представляет собой одно из клеток эмбриональной почки человека (HEK293) или HEK293T, HEK293E, HEK293F, полученных модификацией клеток HEK293, клеток яичника китайского хомячка (CHO) или CHO-S, CHO-dhfr⁻, CHO/DG44, ExpiCHO, полученных модификацией клеток CHO.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на способ рекомбинантного получения части гетеродимера по любому аспекту настоящего изобретения. В некоторых воплощениях способ включает обеспечение клетки-хозяина, содержащей вектор или систему векторов, содержащую одну или более чем одну нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере первую тяжелую цепь и вторую тяжелую цепь гетеродимера по любому аспекту настоящего изобретения, экспрессию нуклеиновых кислот и выделение рекомбинантно полученного гетеродимера.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на композицию, содержащую гетеродимер, описанный выше, и фармацевтически приемлемый носитель, консервант или эксципиент.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на способ введения гетеродимера, описанного выше, субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых воплощениях гетеродимер вводят субъекту для лечения заболевания или состояния. В других воплощениях гетеродимер вводят субъекту для предотвращения заболевания или состояния. В некоторых воплощениях субъект представляет собой млекопитающего. В некоторых воплощениях субъект представляет собой человека.

В некоторых воплощениях заболевание или состояние включает по меньшей мере одно из аутоиммунных заболеваний, иммунного ответа против трансплантатов, аллергических реакций, инфекций, нейродегенеративных заболеваний, опухолевых заболеваний и клеточных пролиферативных расстройств или их комбинации. В некоторых воплощениях аутоиммунные заболевания включают по меньшей мере одно из артрита, ревматоидного артрита, псориаза, рассеянного склероза (РС), язвенного колита, болезни Крона, системной красной волчанки (СКВ), гломерулонефрита, заболеваний наподобие дилатационной кардиомиопатии, синдрома Шегрена, аллергического контактного дерматита, полимиозита, склеродермии, узелкового периартериита, ревматизма, витилиго, инсулинозависимого сахарного диабета, синдрома Бехчета, хронического тиреоидита и их комбинаций. В некоторых воплощениях нейродегенеративные заболевания включают по меньшей мере одно из болезни Паркинсона, болезни Гентингтона, болезни Мачадо-Джозефа, бокового амиотрофического склероза (БАС), болезни Крейтцфельдта-Якоба и их комбинаций. В некоторых воплощениях опухолевые заболевания и клеточные пролиферативные расстройства включают по меньшей мере одно из лейкоза, лимфомы, миеломы, опухолей головного мозга, плоскоклеточного рака головы и шеи, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака носоглотки, рака пищевода, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака печени, колоректального рака,

рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака эндометрия, саркомы матки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, почечноклеточного рака, меланомы и их комбинаций.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на гетеродимер, как описано выше, для применения в медицине.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на гетеродимер для применения в лечении заболевания или состояния. В некоторых воплощениях заболевание или состояние включает по меньшей мере одно из аутоиммунных заболеваний, иммунного ответа против трансплантатов, аллергических реакций, инфекций, нейродегенеративных заболеваний, опухолевых заболеваний и клеточных пролиферативных расстройств или их комбинации.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на применение гетеродимера, как описано выше, для изготовления лекарственного средства.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на применение гетеродимера, как описано выше, для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания или состояния. В некоторых воплощениях гетеродимер представляет собой гетеродимер по любому аспекту настоящего изобретения. В некоторых воплощениях заболевание или состояние включает по меньшей мере одно из аутоиммунных заболеваний, иммунного ответа против трансплантатов, аллергических реакций, инфекций, нейродегенеративных заболеваний, опухолевых заболеваний и клеточных пролиферативных расстройств или их комбинации.

V. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **ФИГ. 1** представлен типичный вектор pDis3. CmV представляет собой цитомегаловирусный промотор, sr представляет собой сигнальный пептид, SUMO представляет собой метку малого убиквитин-подобного модификатора (Small Ubiquitin-related MOdifier), Fc представляет собой кристаллизуемый фрагмент, BGH представляет собой сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (bgh-PolyA), HA представляет собой гемагглютинин вируса гриппа человека, PUC ori представляет собой репликатор pUC, Hydro представляет собой ген резистентности к гигромицину B, AmpR представляет собой ген резистентности к ампициллину, oriP представляет собой репликатор вируса Эпштейна-Барр.

На **ФИГ. 2** представлена структура библиотеки гетеродимеров Fc.

На **ФИГ. 3** представлено спаривание с образованием гомодимеров и гетеродимера.

На **ФИГ. 4** представлена общая структура гетеродимера «антитело против HER2/scFv против CD3».

На **ФИГ. 5** представлен пик элюирования гетеродимера «антитело против HER2/scFv против CD3».

На **ФИГ. 6** представлен SDS-PAGE-анализ гетеродимера «антитело против HER2/scFv против CD3».

На **ФИГ. 7** представлен анализ чистоты гетеродимера «антитело против HER2/scFv против CD3».

На **ФИГ. 8А и 8В** представлена стабильность гетеродимера «антитело против HER2/scFv против CD3» в различных концентрациях: 10 мг/мл, 40°C (**ФИГ. 8А**), 1 мг/мл, 40°C (**ФИГ. 8В**).

На **ФИГ. 9** представлена аффинность связывания гетеродимера «антитело против HER2/scFv против CD3» с FcRn.

На **ФИГ. 10А, 10В, 10С и 10D** представлено одновременное связывание гетеродимера «антитело против HER2/scFv против CD3» с клетками SK-BR-3 и Jurkat: изотипический контроль (**ФИГ. 10А**), mAb против HER2 (**ФИГ. 10В**), тетравалентное гомодимерное BsAb против HER2/CD3 (**ФИГ. 10С**), бивалентное гетеродимерное BsAb против HER2/CD3 (**ФИГ. 10D**).

На **ФИГ. 11А и 11В** представлена цитотоксичность гетеродимера «антитело против HER2/scFv против CD3» *in vitro* в отношении различных клеток-мишеней: SK-BR-3 (**ФИГ. 11А**), BT-474 (**ФИГ. 11В**).

На **ФИГ. 12** представлен фармакокинетический (ФК) профиль гетеродимера «антитело против HER2/scFv против CD3» после однократного внутрибрюшинного введения.

На **ФИГ. 13** представлен SDS-PAGE-анализ гетеродимера «антитело против Троп-2/scFv против CD3».

На **ФИГ. 14** представлена аффинность связывания гетеродимера «антитело против Троп-2/scFv против CD3» с Троп-2.

На **ФИГ. 15А, 15В, 15С и 15D** представлено одновременное связывание гетеродимера «антитело против Троп-2/scFv против CD3» с клетками ВхРС-3 и Jurkat: изотипический контроль (**ФИГ. 15А**), mAb против CD3 (**ФИГ. 15В**), mAb против Троп-2 (**ФИГ. 15С**), гетеродимерное BsAb против Троп-2/CD3 (**ФИГ. 15D**).

На **ФИГ. 16А и 16В** представлена цитотоксичность гетеродимера «антитело против Троп-2/scFv против CD3» *in vitro*: H1650 (**ФИГ. 16А**) и ВхРС-3 (**ФИГ. 16В**).

На **ФИГ. 17** представлен фармакокинетический (ФК) профиль гетеродимера «антитело против Трор-2/scFv против CD3» после однократного внутривенного введения.

На **ФИГ. 18** представлен SDS-PAGE-анализ гетеродимера «антитело против CD20/scFv против CD3».

На **ФИГ. 19А и 19В** представлена стабильность гетеродимера «антитело против CD20/scFv против CD3» в различных концентрациях: 10 мг/мл, 40°C (**ФИГ. 19А**), 1 мг/мл, 40°C (**ФИГ. 19В**).

На **ФИГ. 20** представлен SDS-PAGE-анализ гетеродимера «антитело против PD-L1/scFv против CD3».

На **ФИГ. 21** представлена аффинность связывания гетеродимера «антитело против PD-L1/scFv против CD3» с PD-L1.

На **ФИГ. 22А, 22В, 22С и 22D** представлено одновременное связывание гетеродимера «антитело против PD-L1/scFv против CD3» с клетками H460 и Jurkat: изотипический контроль (**ФИГ. 22А**), mAb против PD-L1 (**ФИГ. 22В**), mAb против CD3 (**ФИГ. 22С**), гетеродимерное BsAb против PD-L1/CD3 (**ФИГ. 22D**).

На **ФИГ. 23А и 23В** представлена цитотоксичность гетеродимера «антитело против PD-L1/scFv против CD3» *in vitro* в отношении различных клеток: HCC827 (**ФИГ. 23А**), H1650 (**ФИГ. 23В**).

На **ФИГ. 24** представлен пик элюирования продуктов экспрессии антитела против CD20.

На **ФИГ. 25** представлена общая структура гетеродимера «антитело против HER2/антитело против CD20».

На **ФИГ. 26** представлена общая структура полумера.

На **ФИГ. 27** представлен SDS-PAGE-анализ продукта восстановления.

На **ФИГ. 28** представлен анализ продукта восстановления эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографией (Size Exclusion-High Performance Liquid Chromatography, SEC-HPLC).

На **ФИГ. 29** представлен SDS-PAGE-анализ продукта окисления.

На **ФИГ. 30** представлен пик элюирования гетеродимера «антитело против HER2/антитело против CD20».

На **ФИГ. 31** представлен SDS-PAGE-анализ гетеродимера «антитело против HER2/антитело против CD20».

На **ФИГ. 32** представлены результаты анализа чистоты гетеродимера «антитело против HER2/антитело против CD20».

На **ФИГ. 33** представлен анализ гетеродимера «антитело против HER2/антитело против CD20».

На **ФИГ. 34А и 34В** представлен масс-спектр гетеродимера «антитело против HER2/антитело против CD20» (ФИГ. 34А) и выравнивание соответствующих последовательностей (ФИГ. 34В). Сплошная линия указывает на то, что аминокислоты идентичны ожидаемым на втором МС, точечная линия указывает на то, что пептиды идентичны ожидаемым на первой МС, а незатененные аминокислоты соответствуют «не обнаруженным».

VI. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится гетеродимерным иммуноглобулиноподобным конструкциям, например (но не обязательно), биспецифичным антителам, имеющим модифицированные константные области тяжелой цепи (например, Fc-область), придающие конструкциям повышенную стабильность и терапевтическую эффективность. Эти конструкции могут быть получены с сохранением полезных свойств нативных IgG и свободными от несоответствия легких и тяжелых цепей. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам получения иммуноглобулиновых конструкций, обычно посредством реакции восстановления с последующей реакцией окисления двух «полуантител» или «полумеров» с образованием гетеродимера. Гетеродимер по настоящему изобретению можно рассматривать как состоящий из двух таких неидентичных полуантител или полумеров, соединенных друг с другом одной или более чем одной дисульфидной связью. Полумер содержит одну цепь мутантной тяжелой цепи иммуноглобулина или ее фрагмент и связанную с ней распознающую группировку (называемую «когнатной» распознающей группировкой данной цепи), которые в физиологических условиях связаны ковалентной связью. Эти полумеры разработаны так, что они имеют модификации в их константных областях тяжелой цепи, подавляющие образование гомодимеров в восстанавливающих условиях, которые, при отсутствии таких модификаций, обычно способствуют или поддерживают гомодимерное спаривание под действием нековалентных сил, и, в то же время, способствующие гетеродимерному связыванию двух комплементарных разработанных полумеров в тех же восстанавливающих условиях. «Гетеродимерное связывание» подразумевает как нековалентные, так и ковалентные силы связывания. При использовании здесь «полуантитело» или «полумер» могут относиться к молекуле или молекулярному

комплексу, который можно рассматривать как содержащий только «половину» полноразмерного иммуноглобулинового гетеротетрамера или производные иммуноглобулина (такие как scFv), то есть он имеет только одну полипептидную цепь из обычных двух, в норме составляющих элемент, связывающийся с Fc-рецептором в типичных физиологических условиях, и одну распознающую группировку, связанную с указанной одной полипептидной цепью. Например, полуантитело или полимер может состоять из тяжелой цепи иммуноглобулина (или ее фрагмента), содержащей определенные мутации, и легкой цепи иммуноглобулина (или ее фрагмента), связанных друг с другом ковалентной связью или нековалентными взаимодействиями, такими гидрофобные силы и водородные связи, и его можно обычно рассматривать как «моновалентное». Или такое «моновалентное» полуантитело или полимер может состоять из одной цепи, содержащей шарнирную область и области C_H2 и C_H3 тяжелой цепи иммуноглобулина с определенными мутациями, связанную, например, ковалентной связью, с распознающей группировкой, не являющейся Fab-фрагментом, например, с одноцепочечным вариабельным фрагментом (scFv) или связывающим доменом рецептора. Типичный «полимер» или «полуантитело», соответствующее первому случаю, показано на **ФИГ. 26**, где присутствуют одна тяжелая цепь и одна легкая цепь иммуноглобулина.

Выход получения гетеродимера по настоящему изобретению сходен с выходом нативного антитела, и предложенный способ прост в осуществлении. В одном воплощении, где гетеродимер состоит из двух разных «полуантител», каждое из которых состоит из полноразмерной тяжелой цепи иммуноглобулина, несущей определенные мутации, и полноразмерной легкой цепи иммуноглобулина, обычно проводят отдельную экспрессию полуантител, например, в двух разных клетках, их отдельную очистку, отдельное восстановление добавлением восстановителя, смешивают их друг с другом и затем проводят их окисление с образованием гетеродимера. В другом воплощении, где гетеродимер состоит из двух разных полимеров, один из которых состоит из полноразмерной тяжелой цепи, несущей определенные мутации, и полноразмерной легкой цепи, в то время как другой представляет собой фрагмент тяжелой цепи, связывающийся с FcR, несущий определенные мутации, связанный с распознающей группировкой, не являющейся Fab-фрагментом, гетеродимер по настоящему изобретению может быть экспрессирован и очищен с использованием одной клеточной линии. Типичные восстановители включают, например, 2-аминоэтантол, дитиотреитол, гидрохлорид трис(2-карбокситил)фосфина и другие химические производные, но восстановители не ограничены указанными вариантами. Типичные окислители включают,

например, L-дегидроаскорбиновую кислоту и другие химические производные, но окислители не ограничены указанными вариантами.

Гетеродимеры по настоящему изобретению могут характеризоваться пятью конкретными нецистеиновыми мутациями в доменах СНЗ гетеродимеров. Они представляют собой Т366, D399, L351, Y407 и К409. Нумерация аминокислотных остатков, использованная здесь, соответствует системе нумерации Kabat EU, например, как описано в Edelman *et al.*, 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-8, полностью включенной сюда посредством ссылки. Система нумерации Kabat EU может быть использована, например, для сравнения последовательности целевого антитела с консенсусной последовательностью, определенной по системе нумерации Kabat EU. Исключительно в качестве примера, пять мутаций могут включать Т366L, D399R, L351E, Y407L и К409V. Тем не менее, изобретение не ограничено указанными мутациями. Например, мутация в положении Т366 может включать любые из следующих неограничивающих примеров: Т366L, Т366P, Т366С, Т366V, Т366S, Т366R и Т366W. Мутация в положении D399 может включать любые из следующих неограничивающих примеров: D399R, D399С, D399H, D399V, D399T, D399A, D399P, D399N, D399I, D399H, D399S, D399G, D399M. Мутация в положении L351 может включать любые из следующих неограничивающих примеров: L351E, L351G, L351R, L351Y, L351T, L351K, L351W, L351V, L351P и L351D. Мутация в положении Y407 может включать любые из следующих неограничивающих примеров: 407L, Y407P, Y407A, Y407R, Y407V, Y407T, Y407H и Y407F. Мутация в положении К409 может включать любые из следующих неограничивающих примеров: К409V, К409С, К409P, К409A, К409F, К409Q, К409R, К409T, К409S, К409M, К409Y и К409N.

В типичных воплощениях мутации в положениях Т366 и D399 присутствуют в первом полипептиде, то есть в домене СНЗ первой тяжелой цепи, а мутации в положениях L351, Y407 и К409 присутствуют во втором полипептиде, то есть в домене СНЗ второй тяжелой цепи. Несмотря на то, что изобретение в прямой форме не ограничено этой комбинацией, она обеспечивает оптимальное спонтанное образование гетеродимеров с хорошей стабильностью и связывающей активностью. Каждый полумер значительно более активно взаимодействует со своим комплементарным полумером-«партнером» или цепью-«партнером», и значительно менее активно – с самой собой, что значительно способствует образованию гетеродимера и значительно препятствует образованию гомодимеров. Когда только один из двух полумеров, составляющих гетеродимер, присутствует в водном растворе в физиологических условиях, являющихся в достаточной степени восстанавливающими, фактически присутствующие полипептидные формы

могут включать полимерную форму, гомодимерную форму, в которой два полимера удерживаются нековалентными силами, и несвернутые формы. В таком растворе доля полипептидных форм в форме гомодимера значительно уменьшена, при условии, что водный раствор по существу свободен от любых полипептидов, отличных от указанного выше полимера, таких как комплементарный «другой» полимер. Иными словами, когда только одну из первой или второй полипептидной цепи и связанную с ней распознающую группировку («когнатную» распознающую группировку полипептидной цепи) помещают в водную среду при физиологических условиях, содержащую достаточное количество восстановителя, такая полипептидная цепь и ее когнатная распознающая группировка не имеют тенденции к образованию гомодимеров, а предпочтительно остаются в водном растворе в форме полимера, при условии, что указанный водный раствор по существу свободен от любых других полипептидов. Такой акт помещения в водную среду включает, например, экспрессию в клетке-хозяине. Сходным образом, при помещении обеих из таких двух полипептидных цепей с их когнатными распознающими группировками в водную среду при физиологических условиях, содержащую достаточное количество восстановителя, возможно присутствие соответствующего гетеродимера и составляющих его полимеров, а образование гомодимеров угнетено. Доля гомодимера, образуемого в присутствии восстановителя, обычно составляет менее 50% по массе, исходя из общей массы всех полипептидных форм (полимеров, гомодимеров, гетеродимеров, несвернутых форм и так далее), присутствующих в водном растворе, когда водный раствор по существу свободен от других полипептидов. Например, в присутствии восстановителя доля (по массе) гомодимеров, образованных первым полипептидом, вторым полипептидом, первым полипептидом, ковалентно связанным с распознающей группировкой, или вторым полипептидом, ковалентно связанным с распознающей группировкой, составляет менее 50%. Например, менее 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или еще меньше.

В определенных воплощениях восстановитель выбран из группы, состоящей из глутатиона, 2-меркаптоэтанола, 2-меркаптоэтиламина, трис(2-карбоксиэтил)фосфина (ТСЕР), цистеина, гидрохлорида цистеина, дитиотреитола (ДТТ), цистеиндитиотреитола, дитиобутиламина, дитиозэритритола (DTE), борогидрида натрия (NaBH_4), цианборогидрида натрия (NaCNBH_3) и/или их комбинаций. В некоторых воплощениях молярная концентрация восстановителя может превышать молярную концентрацию белка в 1-100 раз (например, в 20-50 раз). В определенных воплощениях концентрация восстановителя может составлять от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 20 мМ.

Типичные восстановители, которые могут быть использованы в достаточном количестве, включают дитиотреитол в концентрации 1 мМ или выше, 2-меркаптоэтиламин в концентрации 50 мМ или выше и цистеин в концентрации 50 мМ или выше. В некоторых воплощениях восстановитель удаляют после инкубации с белком перед окислением белка.

Первые полипептиды и вторые полипептиды могут быть по отдельности связаны с распознающей группировкой ковалентной связью или гибким линкером, где распознающая группировка включает, без ограничения, антигенсвязывающий фрагмент, одноцепочечный фрагмент антитела (scFv), лиганд, распознающий рецептор, или рецептор, распознающий лиганд. Ковалентная связь включает химическую связь двух или более атомов с объединением их внешних электронных оболочек. Стабильная химическая структура, образующаяся при достижении этими электронами насыщенного состояния, известна как ковалентная связь. Иными словами, ковалентная связь включает взаимодействие с образованием общих пар электронов у атомов, которые могут принадлежать к одному и тому же элементу или к разным элементам. Ковалентная связь между первыми полипептидами и вторыми полипептидами в настоящем изобретении включает, без ограничения, неамидную связь, синтезированную при взаимодействии аминогруппы одной аминокислоты с карбоксильной группой другой аминокислоты, приводящем к высвобождению молекулы воды (H₂O), или неамидную связь или амидную связь, синтезированную при взаимодействии этиленгликоля, полиэтиленгликоля или альдегидной группы других соединений и их полимеров с аминогруппой молекулы аминокислоты. Гибкий линкер может содержать короткую аминокислотную последовательность или полимер. Такая аминокислотная последовательность включает, без ограничения, GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:72).

Объем настоящего изобретения в прямой форме включает другие комбинации мутаций в положениях T366, D399, L351, Y407 и K409. Например, любые из следующих комбинаций (a)-(h) из группы I и группы II:

группа I:

- a) T366L в первом полипептиде и L351E, Y407L во втором полипептиде;
- b) T366L в первом полипептиде и L351G, Y407L во втором полипептиде;
- c) T366L в первом полипептиде и L351Y, Y407A во втором полипептиде;
- d) T366P в первом полипептиде и L351V, Y407P во втором полипептиде;
- e) T366W в первом полипептиде и L351D, Y407P во втором полипептиде;
- f) T366P в первом полипептиде и L351P, Y407F во втором полипептиде;
- g) T366V в первом полипептиде и L351K, Y407T во втором полипептиде; и

h) T366L в первом полипептиде и L351W, Y407H во втором полипептиде;

группа II:

a) D399R в первом полипептиде и K409V во втором полипептиде;

b) D399C в первом полипептиде и K409C во втором полипептиде;

c) D399C в первом полипептиде и K409P во втором полипептиде;

d) D399N в первом полипептиде и K409S во втором полипептиде;

e) D399G в первом полипептиде и K409S во втором полипептиде;

f) D399I в первом полипептиде и K409F во втором полипептиде;

g) D399T в первом полипептиде и K409Q во втором полипептиде; и

h) D399A в первом полипептиде и K409R во втором полипептиде.

Любые из следующих комбинаций (a)-(h) из группы III и группы IV:

группа III:

a) T366L в первом полипептиде и L351E, Y407L во втором полипептиде;

b) T366L в первом полипептиде и L351G, Y407L во втором полипептиде;

c) T366L в первом полипептиде и L351Y, Y407A во втором полипептиде;

d) T366P в первом полипептиде и L351V, Y407P во втором полипептиде;

e) T66W в первом полипептиде и L351D, Y407P во втором полипептиде;

f) T366P в первом полипептиде и L351P, Y407F во втором полипептиде;

g) T366V в первом полипептиде и L351K, Y407T во втором полипептиде; и

h) T366L в первом полипептиде и L351W, Y407H во втором полипептиде;

группа IV:

a) K409V в первом полипептиде и D399R во втором полипептиде;

b) K409C в первом полипептиде и D399C во втором полипептиде;

c) K409P в первом полипептиде и D399C во втором полипептиде;

d) K409S в первом полипептиде и D399N во втором полипептиде;

e) K409S в первом полипептиде и D399G во втором полипептиде;

f) K409F в первом полипептиде и D399I во втором полипептиде;

g) K409Q в первом полипептиде и D399T во втором полипептиде; и

h) K409R в первом полипептиде и D399A во втором полипептиде.

Любые из следующих элементов (a)-(h) группы V:

группа V:

a) T366L и D399R в первом полипептиде и L351E, Y407L и K409V во втором полипептиде;

b) T366L и D399C в первом полипептиде и L351G, Y407L и K409C во втором полипептиде;

c) T366L и D399C в первом полипептиде и L351Y, Y407A и K409P во втором полипептиде;

d) T366P и D399N в первом полипептиде и L351V, Y407P и K409S во втором полипептиде;

e) T366W и D399G в первом полипептиде и L351D, Y407P и K409S во втором полипептиде;

f) T366P и D399I в первом полипептиде и L351P, Y407F и K409F во втором полипептиде;

g) T366V и D399T в первом полипептиде и L351K, Y407T и K409Q во втором полипептиде; и

h) T366L и D399A в первом полипептиде и L351W, Y407H и K409R во втором полипептиде.

Любые из следующих элементов (a)-(h) группы VI:

группа VI:

a) T366L и K409V в первом полипептиде и L351E, Y407L и D399R во втором полипептиде;

b) T366L и K409C в первом полипептиде и L351G, Y407L и D399C во втором полипептиде;

c) T366L и K409P в первом полипептиде и L351Y, Y407A и D399C во втором полипептиде;

d) T366P и K409S в первом полипептиде и L351V, Y407P и D399N во втором полипептиде;

e) T366W и K409S в первом полипептиде и L351D, Y407P и D399G во втором полипептиде;

f) T366P и K409F в первом полипептиде и L351P, Y407F и D399I во втором полипептиде;

g) T366V и K409Q в первом полипептиде и L351K, Y407T и D399T во втором полипептиде; и

h) T366L и K409R в первом полипептиде и L351W, Y407H и D399A во втором полипептиде.

Каждый из первого полипептида и второго полипептида может содержать тяжелую цепь. Гетеродимерные конструкции по настоящему изобретению могут содержать

биспецифичные антитела, но в прямой форме не ограничены ими. Например, гетеродимерные конструкции могут содержать один или более чем один scFv-фрагмент, один или более чем один Fab-фрагмент, например, scFv-фрагмент и Fab-фрагмент или два Fab-фрагмента. Типичные последовательности полипептидов гетеродимеров включают, без ограничения, любые из SEQ ID NO:16-31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 48, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 68, 69, 70 и 71. Также включены варианты последовательностей, по меньшей мере на 70% идентичные (с сохранением биологической активности) любой из SEQ ID NO:16-31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 48, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 68, 69, 70 и 71. Например, идентичные по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или более. Кроме того, любая из SEQ ID NO:16-31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 48, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 68, 69, 70 и 71 может иметь одну или более чем одну консервативную замену и все равно входить в объем настоящего изобретения.

В биспецифичных гетеродимерных антителах по настоящему изобретению между первой и второй тяжелой цепью образуется одна или более чем одна дисульфидная связь. Образование дисульфидных связей может происходить либо во время экспрессии в одной и той же клетке, либо посредством реакции окисления при добавлении окислителя *in vitro*. Такое образование дисульфидных связей происходит в тех воплощениях, где проводят экспрессию полумеров, их очистку, восстановление добавлением восстановителя, смешивают их друг с другом и затем проводят их окисление с образованием гетеродимера.

Гетеродимеры по настоящему изобретению способны связываться с Fc-рецепторами, например, с одним или более из FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB1, FcγRIIB2, FcγRIIA, FcγRIIB, FcεRI, FcεRII, FcαRI, Fcα/μR и FcRn. В типичных воплощениях гетеродимеры сохраняют способность связываться с FcRn. При использовании здесь FcRn относится к рецептору, который структурно гомологичен семейству гетеродимерных рецепторов МНС класса I и содержит трансмембранную тяжелую цепь класса I (субъединица p51, альфа-цепь) и растворимую легкую цепь (субъединица p14, бета-цепь), соединенные друг с другом нековалентным взаимодействием. Сайт связывания FcRn на IgG расположен на линии соприкосновения CH2-CH3. Наиболее важными являются аминокислотные положения 253, 310 и 435.

В силу своих структурных характеристик, гетеродимеры по настоящему изобретению могут (но не обязательно) оказывать целевое воздействие на один или более чем один антиген одновременно. В типичных воплощениях антигены включают одно или

более из HER2, PD-L1, TROP2, CD3 и/или CD20. Тем не менее, изобретение не ограничено указанными антигенами. Это связано с тем, что настоящее изобретение относится к модификациям константной области (СНЗ) антител / иммуноглобулиновых конструкций для улучшения их стабильности, периода полувыведения из сыворотки и терапевтической эффективности. Таким образом, технология, лежащая в основе настоящего изобретения, может быть применена к моноклональным антителам, связывающимся только с одним антигеном-мишенью. Это включает, например, известные терапевтические антитела. Такие антитела все еще могут быть усовершенствованы, благодаря повышенной стабильности, обеспечиваемой модифицированными константными областями. В таких случаях распознающие группировки на (или связанные с) первым полипептиде и втором полипептиде будут оставаться неизменными, и «полуантитела» или «полумеры» могут различаться исключительно в области СНЗ.

Известные терапевтические моноклональные антитела, которые могут быть усовершенствованы модификациями, раскрытыми в настоящем изобретении, могут включать любые из следующих неограничивающих 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 равтансин, анифролумаб, анрукинзумаб, аполизумаб, арцитумомаб, аскринвакумаб, аселизумаб, атезолизумаб, атинумаб, атлизумаб, аторолимумаб, авелумаб, бапинеизумаб, базиликсимаб, бавитуксимаб, бектумомаб, бегеломаб, белимумаб, бенрализумаб, бертилимумаб, бесилесомаб, бевацизумаб, безлостокумаб, бициромаб, бимагрумаб, бимекизумаб, биватузумаб мертансин, блеселумаб, блинатумомаб, блонтуветмаб, блосокумаб, бокоцизумаб, бразикумаб, брентуксимаб ведотин, бриакинумаб, бродалумаб, бролуцизумаб, бронтиктузумаб, буросумаб, кабирализумаб, канакинумаб, кантузумаб мертансин, кантузумаб равтансин, каплацизумаб, капромаб пендетид, карлумаб, каротуксимаб, катумаксумаб, иммуноконъюгат сBR96-доксорубин, целелизумаб, цергугузумаб амуналейкин, цертолизумаб пегол, цетуксимаб, цитатузумаб богатокс, циксутумумаб, клазакизумаб, кленоликсимаб, кливатузумаб тетраксетан, кодритузумаб, колтуксимаб равтансин, 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,

экроексимаб, экулизумаб, эдобакомаб, эдреколомаб, эфализумаб, эфунгумаб, элделумаб, элгемтумаб, элотузумаб, элсилимомаб, эмактузумаб, эмибетузумаб, эмицизумаб, энаватузумаб, энфортумаб ведотин, энлимомаб пегол, эноблитузумаб, энокизумаб, энотикумаб, энситуксимаб, эпитумомаб цитуксетан, эпратузумаб, эренумаб, эрлизумаб, эртумаксумаб, этарацизумаб, этролизумаб, эвинакумаб, эволокумаб, эксбивирумаб, фанолесумаб, фаралимомаб, фарлетузумаб, фасинумаб, FВТА05, фелвизумаб, фезакинумаб, фибатузумаб, фиклатузумаб, фигитумумаб, фиривумаб, фланвотумаб, флетикумаб, фонтолизумаб, форалумаб, форавирумаб, фресолимумаб, фулранумаб, футуксимаб, галцанезумаб, галиксимаб, ганитумаб, гантенерумаб, гавилимомаб, гемтузумаб озогамидин, гевокизумаб, гирентуксимаб, глембатумумаб ведотин, голимумаб, гомиликсимаб, гуселькумаб, ибализумаб, ибритумомаб тиуксетан, икрукумаб, идаруцизумаб, иговомаб, IMAВ362, ималумаб, имциромаб, имгатузумаб, инклакумаб, индатуксимаб равтансин, индусатумаб ведотин, инебилизумаб, инфликсимаб, инолимомаб, инотузумаб озогамидин, интетумумаб, ипилимумаб, иратумумаб, исатуксимаб, итолизумаб, иксекизумаб, келиксимаб, лабетузумаб, лампализумаб, ланаделумаб, ландогрозумаб, лапритуксимаб эмтанзин, лебрикизумаб, лемалесумаб, лендализумаб, лензилумаб, лерделимумаб, лексатумумаб, либивирумаб, лифастузумаб ведотин, лигелизумаб, лилотомаб сатетраксетан, линтузумаб, лирилумаб, лоделцизумаб, локиветмаб, лорвотузумаб мертансин, лукатумумаб, лулизумаб пегол, лумиликсимаб, лумретузумаб, МАВp1, мапатумумаб, маргетуксимаб, маслимомаб, матузумаб, маврилимумаб, меполизумаб, метелимумаб, милатузумаб, минретумомаб, мирветуксимаб соравтансин, 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, отлертузумаб, 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,

квилизумаб, ракотумомаб, радретумаб, рафивирумаб, ралпанцизумаб, рамуцирумаб, ранибизумаб, раксибакумаб, рефанезумаб, регавирумаб, реслизумаб, рилотумумаб, ринукумаб, рисанкизумаб, ритуксимаб, ривабазумаб пегол, робатумумаб, роледумаб, ромосозумаб, ронтализумаб, ровалпитузумаб тесирин, ровелизумаб, руплизумаб, сакитузумаб говитекан, самализумаб, сапелизумаб, сарилумаб, сатумомаб пендетид, секукинумаб, серибантумаб, сетоксаксимаб, севирумаб, SGN-CD19A, SGN-CD33A, сибротузумаб, сифалимумаб, силтуксимаб, симтузумаб, сиплизумаб, сирукумаб, софитузумаб ведотин, соланезумаб, солитомаб, сонепцизумаб, сонтузумаб, стамулумаб, сулесомаб, сувизумаб, табалумаб, такатузумаб тетраксетан, тадоцизумаб, тализумаб, тамтуетмаб, танезумаб, таплитумомаб паптокс, тарекстумаб, тефибазумаб, телимомаб аритокс, тенатумомаб, тенеликсимаб, теплизумаб, тепротумумаб, тесидолумаб, тетуломаб, тезепелумаб, TGN1412, тицилимумаб, тигатузумаб, тилдракизумаб, тимолумаб, тисотумаб ведотин, TNX-650, тоцилизумаб, торализумаб, тосатоксумаб, тозитумомаб, товетумаб, тралокинумаб, трастузумаб, трастузумаб эмтанзин, TRBS07, трегализумаб, тремелимумаб, тревогрумаб, тукотузумаб целмолейкин, тувирумаб, ублитуксимаб, улоцуплумаб, урелумаб, уртоксазумаб, устекинумаб, утомилумаб, вадастуксимаб талирин, вандортузумаб ведотин, вантуктумаб, вануцизумаб, вапаликсимаб, варлилумаб, вателизумаб, ведолизумаб, велтузумаб, вепалимомаб, весенцумаб, визилизумаб, вобарилизумаб, волоциксимаб, ворсетузумаб мафодотин, вотумумаб, ксентузумаб, залутумумаб, занолимумаб, затуксимаб, зиралимумаб, золимомаб аритокс и их комбинации.

Мишени могут включать любые из следующих неограничивающих мишеней: β -амилоид, 4-1BB, 5AC, 5T4, α -фетопротеин, ангиопоэтин, AOC3, B7-H3, BAFF, c-MET, c-MYC, антиген C242, C5, CA-125, CCL11, CCR2, CCR4, CCR5, CD4, CD8, CD11, CD18, CD125, CD140a, CD127, CD15, CD152, CD140, CD19, CD2, CD20, CD22, CD23, CD25, CD27, CD274, CD276, CD28, CD3, CD30, CD33, CD37, CD38, CD4, CD40, CD41, CD44, CD47, CD5, CD51, CD52, CD56, CD6, CD74, CD80, CEA, CFD, CGRP, CLDN, CSF1R, CSF2, CTGF, CTLA-4, CXCR4, CXCR7, DKK1, DLL3, DLL4, DR5, EGFL7, EGFR, EPCAM, ERBB2, ERBB3, FAP, FGF23, FGFR1, GD2, GD3, GDF-8, GPNMB, GUCY2C, HER1, HER2, HGF, HIV-1, HSP90, ICAM-1, IFN- α , IFN- γ , IgE, CD221, IGF1, IGF2, IGHE, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6R, IL-9, IL-12, IL-15, IL-15R, IL-17, IL-13, IL-18, IL-1 β , IL-22, IL-23, IL-23A, интегрин, ITGA2, IGTB2, антиген Льюиса Y, LFA-1, LOXL2, LTA, MCP-1, MIF, MS5A1, MUC1, MUC16, MSLN, миостатин, суперсемейство MMP, NCA-90, NFG, NOGO-A, Notch 1, NRP1, OX-40, OX-40L, суперсемейство P2X, PCSK9, PD-1, PD-L1, PDCD1,

PDGF-R, RANKL, RHD, RON, TRN4, сывороточный альбумин, SDC1, SLAMF7, SIRP α , SOST, SHP1, SHP2, STEAP1, TAG-72, TEM1, TIGIT, TFPI, TGF- β , TNF- α , суперсемейство TNF, суперсемейство TRAIL, Toll-подобные рецепторы, суперсемейства WNT, VEGF-A, VEGFR-1, VWF, цитомегаловирус (CMV), респираторно-синцитиальный вирус (RSV), вирус гепатита В, вирус гепатита С, гемагглютинин вируса гриппа А, вирус бешенства, вирус ВИЧ, вирус простого герпеса и их комбинации.

Гетеродимерные конструкции по настоящему изобретению могут иметь одну или более чем одну замену, делецию, присоединение и/или вставку, помимо пяти конкретных раскрытых здесь аминокислотных замен в домене СНЗ. Например, определенные аминокислоты белковой структуры могут быть заменены другими аминокислотами без существенного снижения способности связываться с другими полипептидами, такими как антигены, или клетками. Поскольку способность к связыванию и свойства белка определяют его биологическую активность, определенные аминокислоты в аминокислотной последовательности белка могут быть заменены без существенного снижения его биологической полезности или активности. Во многих случаях полипептидные варианты содержат одну или более чем одну консервативную замену.

Гетеродимерные конструкции по настоящему изобретению могут быть представлены в форме фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или растворитель. Возможно, композиция может содержать один или более чем один дополнительный фармацевтически активный ингредиент, такой как другое антитело или терапевтический агент. Фармацевтические композиции по изобретению могут также быть введены в рамках комбинированной терапии, например, с другим иммуностимулирующим агентом, противораковым агентом, противовирусным агентом, вакциной и так далее. В определенных воплощениях композиция содержит гетеродимер в концентрации по меньшей мере 1 мг/мл, 5 мг/мл, 10 мг/мл, 50 мг/мл, 100 мг/мл, 150 мг/мл или 200 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация гетеродимера может составлять 1-300 мг/мл или 100-300 мг/мл.

Фармацевтическая композиция может содержать любое число эксципиентов. Эксципиенты, которые могут быть использованы, включают носители, поверхностно-активные агенты, загустители или эмульгаторы, твердые связывающие вещества, диспергирующие или суспендирующие вещества, солубилизаторы, красители, корригенты, покрытия, разрыхлители, смазки, подсластители, консерванты, изотонические агенты и их комбинации. Выбор и применение подходящих эксципиентов описаны в Gennaro, ed., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed.

(Lippincott Williams & Wilkins 2003), содержание которой включено сюда посредством ссылки.

Предпочтительно, фармацевтическая композиция является подходящей для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, инъекцией или инфузией). В зависимости от пути введения, активное соединение может быть покрыто веществом, защищающим его от действия кислот и других естественных условий, которые могут привести к его инактивации. При использовании здесь фраза «парентеральное введение» обозначает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно инъекционные, и включает без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, интракардиальную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, интраартикулярную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интратермальную инъекцию и инфузию. Альтернативно, антители по настоящему изобретению, описанное здесь, может быть введено непарентеральным путем, таким как местный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

Фармацевтическая композиция по изобретению может быть представлена в форме фармацевтически приемлемых солей. «Фармацевтически приемлемая соль» относится к соли, которая сохраняет желаемую биологическую активность исходного соединения и не оказывает никаких нежелательных токсикологических эффектов. Примеры таких солей включают соли присоединения кислот и соли присоединения оснований. Соли присоединения кислот включают соли, имеющие происхождение от нетоксичных неорганических кислот, таких как соляная, азотная, фосфорная, серная, бромоводородная, йодоводородная, фосфористая и тому подобные, а также от нетоксичных органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенил-замещенные алкановые кислоты, гидроксилкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфоновые кислоты и тому подобные. Соли присоединения оснований включают соли, имеющие происхождение от щелочных и щелочноземельных металлов, таких как натрий, калий, магний, кальций и тому подобные, а также от нетоксичных органических аминов, таких как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и тому подобные.

Фармацевтически приемлемая композиция может быть представлена в жидкой форме или в твердой форме. Твердая композиция обычно, но не обязательно, лиофилизирована, и перед введением из нее получают раствор для однократного или многократного введения. Воздействия экстремальных температур или pH на композиции необходимо избегать, чтобы не допустить термической денатурации. Таким образом, композиция антител по настоящему изобретению должна быть изготовлена так, чтобы иметь биологически приемлемый pH. Часто необходим раствор, забуференный для поддержания соответствующего диапазона pH, особенно в случае жидких композиций, хранящихся на протяжении длительных периодов времени от изготовления до введения. Обычно как жидкие, так и твердые композиции необходимо хранить при пониженных температурах (обычно 2-8°C) для сохранения стабильности на протяжении более длительных периодов времени. Изготовленные композиции антител, особенно жидкие композиции, могут содержать бактериостатический агент для предотвращения или минимизации протеолиза во время хранения, включая, без ограничения, эффективные концентрации (обычно менее 1% масс./об.) бензилового спирта, фенола, м-крезола, хлорбутанола, метилпарабена и/или пропилпарабена. Бактериостатический агент может быть противопоказан некоторым пациентам. Таким образом, лиофилизованная композиция может быть восстановлена в растворе, содержащем или не содержащем такой компонент. В забуференную жидкую или твердую композицию антител могут быть добавлены дополнительные компоненты, включая, без ограничения, сахара в качестве криопротекторов (включая, без ограничения, полигидроксиуглеводороды, такие как сорбит, маннит, глицерин и дульцит, и/или дисахариды, такие как сахароза, лактоза, мальтоза или трегалоза) и, в некоторых случаях, соответствующая соль (включая, без ограничения, NaCl, KCl или LiCl). Важным свойством таких композиций антител, особенно жидких композиций, предназначенных для длительного хранения, будет диапазон общей осмолярности, полезный как с точки зрения повышения стабильности во время длительного хранения при температуре 2-8°C или выше, так и с точки зрения возможности их парентерального введения. Например, но не обязательно, эффективный диапазон общей осмолярности (общего числа молекул в растворе) может составлять от приблизительно 200 мОсм/л до приблизительно 800 мОсм/л. Очевидно, что количество криопротектора, такого как сахароза или сорбит, будет зависеть от количества соли в композиции, чтобы общая осмолярность раствора не выходила за пределы соответствующего диапазона. Поэтому свободная от соли композиция может, но не обязательно, содержать от приблизительно 5% до приблизительно 25% сахарозы.

Альтернативно, свободная от соли композиция на основе сорбита может, но не обязательно, содержать сорбит в диапазоне от приблизительно 3% до приблизительно 12%. Разумеется, в свободных от соли композициях диапазоны соответствующего криопротектора должны быть больше, чтобы поддерживать эффективные уровни осмолярности. Эти композиции могут также содержать двухвалентный катион (включая, без ограничения, $MgCl_2$, $CaCl_2$ и $MnCl_2$); неионное поверхностно-активное вещество (включая, без ограничения, полисорбат-80 (Tween 80®), полисорбат-60 (Tween 60®), полисорбат-40 (Tween 40®) и полисорбат-20 (Tween 20®), алкиловые эфиры полиоксиэтилена, включая, без ограничения, Brij 58®, Brij 35®, а также другие, такие как Triton X-100®, Triton X-114®, NP40®, Span 85 и серию неионных поверхностно-активных веществ Pluronic (например, Pluronic 121)). В композициях по настоящему изобретению, содержащих антитела, может быть использована любая комбинация таких компонентов, включая, вероятно, бактериостатический агент. Гетеродимер по настоящему изобретению может также представлять собой «химическое производное», под которым понимают антитело, содержащее дополнительные химические группировки, обычно не являющиеся частью молекулы иммуноглобулина (например, пегилирование). Такие группировки могут улучшать растворимость, период полувыведения, абсорбцию исходной молекулы и так далее. Альтернативно, эти группировки могут ослаблять нежелательные побочные эффекты исходной молекулы или уменьшать токсичность исходной молекулы. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть представлена в форме стерильных водных растворов или дисперсий. Она может также быть изготовлена в форме микроэмульсии, липосом или других заданных структур, подходящих для высокой концентрации лекарственного средства.

Гетеродимерные конструкции по настоящему изобретению способны связываться с несколькими молекулами-мишенями одновременно и поэтому более эффективны в лечении сложных заболеваний. Гетеродимерные конструкции по настоящему изобретению могут быть введены субъекту, нуждающемуся в этом, для лечения заболевания или расстройства, например, вирусной или бактериальной инфекции, метаболического или аутоиммунного расстройства или рака или другого клеточного пролиферативного расстройства. В некоторых воплощениях аутоиммунные заболевания включают по меньшей мере одно из артрита, ревматоидного артрита, псориаза, рассеянного склероза (РС), язвенного колита, болезни Крона, системной красной волчанки (СКВ), гломерулонефрита, заболеваний наподобие дилатационной кардиомиопатии, синдрома Шегрена, аллергического контактного дерматита, полимиозита, склеродермии,

узелкового периартериита, ревматизма, витилиго, инсулинозависимого сахарного диабета, синдрома Бехчета, хронического тиреоидита и их комбинаций. В некоторых воплощениях нейродегенеративные заболевания включают по меньшей мере одно из болезни Паркинсона, болезни Гентингтона, болезни Мачадо-Джозефа, бокового амиотрофического склероза (БАС), болезни Крейтцфельда-Якоба и их комбинаций. В некоторых воплощениях опухолевые заболевания и клеточные пролиферативные расстройства включают по меньшей мере одно из лейкоза, лимфомы, миеломы, опухолей головного мозга, плоскоклеточного рака головы и шеи, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака носоглотки, рака пищевода, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака печени, колоректального рака, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака эндометрия, саркомы матки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, почечноклеточного рака, меланомы и их комбинаций.

Кроме того, настоящее изобретение направлено на одну или более чем одну нуклеиновую кислоту, кодирующую один или более чем один полипептид гетеродимерных конструкций по настоящему изобретению. Типичные нуклеиновые кислоты кодируют любую из SEQ ID NO:16-31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 48, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 68, 69, 70 и 71. В некоторых воплощениях нуклеиновые кислоты могут содержать любую из SEQ ID NO:32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 47, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62 и 64-67. Также включены варианты последовательностей, по меньшей мере на 70% идентичные любой из SEQ ID NO:32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 47, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62 и 64-67. Например, идентичные по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или более. Кодоны вариантных последовательностей нуклеиновых кислот могут быть оптимизированы. При использовании здесь оптимизация кодонов относится к *in vitro*-мутагенезу нуклеиновой кислоты для повышения или максимизации экспрессии гена (например, трансгенного относительно немодифицированной нуклеиновой кислоты без изменения (или с минимальным изменением) аминокислотной последовательности синтезируемого белка), то есть к синонимичным мутациям. Оптимизация кодонов позволяет повысить уровни экспрессии белка до 1000 раз и особенно эффективна применительно к экспрессии растворимого белка. В большинстве случаев заменяют те кодоны, которые не используются трансляционной системой клетки-хозяина.

Объем данного изобретения включает последовательности нуклеиновых кислот, способные гибридизоваться с нуклеиновой кислотой или фрагментом (или комплементарной последовательностью) по настоящему изобретению в условиях

умеренной или высокой жесткости. Методики гибридизации хорошо известны в области молекулярной биологии. Например, подходящие условия анализа включают предварительную промывку в растворе 5x SSC, 0,5% SDS, 1,0 мМ EDTA (pH 8,0); гибридизацию в течение ночи при 50-60°C, 5x SSC; с последующей двукратной промывкой на протяжении 20 минут с использованием 2x, 0,5x и 0,2x раствора SSC, содержащего 0,1%- SDS, соответственно. Альтернативно, подходящие условия высокой жесткости для гибридизации включают условия, описанные выше, за исключением повышения температуры гибридизации, например, до 60-65°C или 65-70°C.

Нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут содержаться в векторе или системе векторов. Вектор может представлять собой, например, но не обязательно, плазмиду. Другие явно не ограничивающие рекомбинантные векторы включают «челночные» векторы и векторы экспрессии. Обычно плазмидная конструкция содержит репликатор (например, репликатор ColE1) и селективные маркеры (например, резистентности к ампициллину или тетрациклину). Векторы экспрессии включают векторы, содержащие контрольную последовательность или регуляторный элемент, необходимый для экспрессии, например, гетеродимерной конструкции по настоящему изобретению. Другие явно не ограничивающие рекомбинантные векторы известны в данной области и могут включать, например, фаговые векторы, такие как вектор на основе фага λ , другие вирусные векторы, такие как нереплицирующийся аденовирусный вектор, лентивирусный вектор, серии плазмидных векторов pSV и pCMV, векторы на основе вируса коровьей оспы и ретровирусные векторы, бакуловирусные векторы, космиды и искусственные хромосомы. Вектор экспрессии может представлять собой вектор экспрессии для клеток млекопитающих. Например, векторы могут быть использованы для трансфекции клеток млекопитающих, и, в случае стабильной трансфекции, ДНК может быть интегрирована в геном гомологичной рекомбинацией, или, альтернативно, может быть проведена транзиторная трансфекция клеток. Большинство сконструированных векторов содержат репликаторы, множественные сайты клонирования и селективные маркеры, поэтому векторы (включая системы векторов, например, из нескольких плазмид), содержащие такую систему, рассматриваются как входящие в объем данного изобретения. Промоторы, часто используемые в векторах экспрессии для клеток млекопитающих, включают промоторы CMV и SV40. Также известны невирусные промоторы, такие как EF-1. Типичные векторы включают плазмидные векторы pX0GC, полученные модификацией векторов pCDNA.

Настоящее изобретение также включает клетки-хозяева, содержащие вектор или систему векторов по любому аспекту настоящего изобретения. Специалисту в данной области будет ясно, что использование разных типов клеток может приводить к различиям в полученных гетеродимерных конструкциях и, возможно, может влиять на их терапевтическую эффективность. Например, клетки-хозяева могут (но не обязательно) включать любые из следующих типов клеток: клетки эмбриональной почки человека (НЕК293) или НЕК293Т, НЕК293Е, НЕК293F, полученные модификацией клеток НЕК293, клетки яичника китайского хомячка (СНО) или СНО-S, СНО-dhfr⁻, СНО/DG44, ExpiСНО, полученные модификацией клеток СНО, и родственные клеточные линии. Другие клеточные линии, известные в данной области, включают клетки мышинной миеломы NS0, человеческие клетки PER.C6, клетки дрожжей, например, *S. cerevisiae*, *S. pombe* и *P. pastoris*, и клетки бактерий, например, *E. coli*. Также существуют бесклеточные системы экспрессии, например, на основе лизатов клеток *E. coli*, содержащих компоненты клеток, необходимые для транскрипции/трансляции. В данной области также известны бесклеточные системы, полученные из эукариотических клеток и клеток млекопитающих, например, бесклеточная система экспрессии, полученная из зародышевых клеток пшеницы, и системы, описанные в Brodel *et al.* (2015), *Methods Mol Bio.* 1261: 129-40, полностью включенной сюда посредством ссылки. В некоторых системах для получения рекомбинантных антител происходит экспрессия рекомбинантных антител на поверхности клеток-хозяев перед их сбором, а в других – простое высвобождение получаемых антител в среду. Подразумевается, что такие варианты входят в объем настоящего изобретения.

При использовании здесь термин «антитело» (Ab) использован в наиболее широком смысле и, конкретно, может включать любой иммуноглобулин, естественный или полученный частично или полностью синтетическим путем, включая, без ограничения, моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела и полиреактивные антитела) и фрагменты антител. Таким образом, подразумевается, что при использовании в любом контексте в данном изобретении термин «антитело» включает, без ограничения, любой специфичный связывающий элемент, класс и/или изотип иммуноглобулина (например, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE) и их биологически значимые фрагменты или специфичные связывающие элементы, включая, без ограничения, Fab, F(ab')₂, scFv (одноцепочечный или родственный ему фрагмент) и (scFv)₂.

При использовании здесь термин «фрагменты антител» может включать фрагменты антител, полученные с применением методик, хорошо известных и доступных специалистам в данной области, как описано здесь. Таким образом, в дополнение к определению «антитела», представленному выше, термин «антитело» может дополнительно включать любой полипептид или белок, содержащий часть интактного антитела, такую как антигенсвязывающая или вариабельная область интактного антитела. Они могут иметь происхождение из естественных источников или могут быть получены частично или полностью синтетическим путем. Примеры фрагментов антител включают, без ограничения, Fab-, Fab'-, F(ab')₂- и Fv-фрагменты, димера и линейные антитела.

При использовании здесь термин «антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» или «ADCC» может относиться к клеточно-опосредованной реакции, при которой цитотоксические клетки (например, неспецифические), экспрессирующие FcR (например, натуральные клетки-киллеры (NK-клетки), нейтрофилы и макрофаги) распознают связанное антитело на клетке-мишени и затем приводят к лизису клеток-мишеней. Основные клетки, опосредующие ADCC, NK-клетки, экспрессируют FcγRIII, в то время как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII.

При использовании здесь термин «биспецифичное антитело» относится к антителу, способному связываться с двумя разными эпитопами одного антигена или двух разных антигенов. Эпитопы могут быть образованы как смежными аминокислотами (линейные эпитопы), так и несмежными аминокислотами, расположенными друг рядом с другом при формировании третичной структуры белка (конформационные эпитопы). Эпитопы, образованные смежными аминокислотами, обычно сохраняются при воздействии денатурирующими растворителями, в то время как эпитопы, образованные третичной структурой, обычно утрачиваются при воздействии денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно содержит по меньшей мере 3, а чаще по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот, расположенных в уникальной пространственной конформации. Биспецифичное антитело по настоящему изобретению может быть бивалентным, тривалентным или тетравалентным. При использовании здесь «валентный», «валентность», «валентности» или их другие грамматические варианты обозначают число антигенсвязывающих сайтов в молекуле антитела. Эти сайты распознавания могут распознавать один и тот же эпитоп или разные эпитопы.

При использовании здесь термин «носители» может включать фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы, нетоксичные для клетки или млекопитающего, на которого они воздействуют в используемых дозах и концентрациях.

Часто фармацевтически приемлемый носитель представляет собой водный pH-буферный раствор. Примеры физиологически приемлемых носителей включают, без ограничения: буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая, без ограничения, аскорбиновую кислоту; пептиды малой молекулярной массы (менее 10 остатков); белки, такие как, без ограничения, сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как, без ограничения, поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как, без ограничения, глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая, без ограничения, глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как, без ограничения, EDTA; сахарные спирты, такие как, без ограничения, маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как, без ограничения, натрий; и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как, без ограничения, TWEEN, полиэтиленгликоль (PEG) и PLURONIC. В композициях по настоящему изобретению может быть использована любая комбинация таких компонентов, включая, вероятно, бактериостатический агент.

При использовании здесь термины «консервативные модификации последовательности» или «консервативные замены» могут относиться к аминокислотным модификациям эпитопа-мишени или антител и их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению, не оказывающим существенного влияния на или не изменяющим характеристики связывания гетеродимерных иммуноглобулиновых конструкций по настоящему изобретению. Такие консервативные модификации включают аминокислотные замены, присоединения и делеции. Антитело по изобретению может быть модифицировано стандартными методиками, известными в данной области, такими как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные аминокислотные замены представляют собой аминокислотные замены, при которых аминокислотный остаток заменяют аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Такие замены обычно основаны на относительном сходстве заместителей в боковых цепях аминокислот, например, на их гидрофобности, гидрофильности, заряде, размере и так далее. В данной области определены семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин,

изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин), и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

При использовании здесь термин «внеклеточный домен» или «внеклеточный домен мембранного рецептора» относится к последовательности (последовательностям) молекулярного распознавания, обычно включающей внеклеточные области, расположенные за пределами клетки, распознающие и связывающие соответствующий антиген или лиганд, связанные с рецептором в его трансмембранном домене и взаимодействующие с внутриклеточным доменом, обладающим внутриклеточной киназной активностью, или с сигнальными путями. Лиганд может относиться к белку, малому пептиду или соединению, которое может быть распознано и связано внеклеточным доменом мембранного рецептора. Иммуногенные, митогенные или другие стимулы могут стимулировать образование растворимых белков малой молекулярной массы различными клетками. Они могут модулировать врожденный и адаптивный иммунитет, гемопоэз, рост клеток, APSC плюрипотентные клетки и корректировать репарацию тканей после повреждения. Цитокины могут быть разделены на интерлейкины, интерфероны, суперсемейство фактора некроза опухоли, колониестимулирующие факторы, хемокины, гормоны роста. Метка на экспрессируемом белке относится к аминокислотной последовательности, присоединенной к N-концу или C-концу целевого белка, которая может представлять собой малый пептид или длинную аминокислоту. Присоединение метки может способствовать правильному сворачиванию белка и может быть использовано для разделения и очистки белка. Она может быть полезна для уменьшения деградации белков в клетке. Часто используемые метки включают, без ограничения, HA, SUMO, His, GST, GFP и Flag.

При использовании здесь термин «Fab-фрагмент» может относиться к распознающей группировке, представляющей собой фрагмент антигенсвязывающего фрагмента (Fab) любой из двух половин молекулы антитела, содержащей связанные между собой легкую цепь и домены VH и CH1 тяжелой цепи.

При использовании здесь термин «Fc» относится к области «критализуемого фрагмента», которая содержит константные домены CH2 и CH3 и представляет собой область иммуноглобулина, взаимодействующую с эффекторными молекулами или клетками, например, с Fc-рецепторами.

При использовании здесь термин «Fc-рецептор» или «FcR» использован для описания рецептора, связывающегося с Fc-областью (например, Fc-областью антитела или

фрагмента антитела). Данный термин включает неонатальный рецептор, FcRn, обеспечивающий перенос материнских IgG плоду. Другие Fc-рецепторы включают любой из FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB1, FcγRIIB2, FcγRIIA, FcγRIIB, FcεRI, FcεRII, FcαRI и Fcα/μR.

При использовании здесь термин «гомология» может относиться к наличию у двух композиций общей структуры. Применительно к белкам термин «гомология» может относиться к степени (например, в процентном выражении) совпадения двух или более аминокислотных и/или пептидных последовательностей. Применительно к нуклеиновым кислотам термин «гомология» может относиться к степени (например, в процентном выражении) совпадения последовательностей двух или более нуклеиновых кислот. При использовании здесь процент (%) гомологии двух последовательностей эквивалентен проценту идентичности этих двух последовательностей. Процент идентичности двух последовательностей является функцией числа идентичных положений в этих последовательностях (то есть, % гомологии равен отношению числа идентичных положений к общему числу положений, умноженному на 100), с учетом числа разрывов и длины каждого разрыва, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности двух последовательностей можно провести с применением математического алгоритма. Такая гомология хорошо представлена в инструментах и/или алгоритмах локального выравнивания и может включать попарное выравнивание, методы множественного выравнивания последовательностей, методы структурного выравнивания и/или методы филогенетического анализа. Когда последовательности различаются консервативными заменами, процент идентичности последовательностей можно, но не обязательно, корректировать в сторону повышения для учета консервативной природы замен. Способы такой корректировки хорошо известны специалистам в данной области. Обычно, но не обязательно, они включают учет консервативной замены как частичного, а не полного несовпадения, что повышает процент идентичности последовательностей. Так, например, если идентичной аминокислоте присваивается значение 1, а неконсервативной замене присваивается значение «ноль», то консервативной замене присваивается значение между нулем и 1.

При использовании здесь термин «иммуноглобулин» относится к симметричной структуре с четырьмя полипептидными цепями, включая две тяжелые цепи с более протяженной последовательностью, содержащей 450-550 аминокислотных остатков, и большей относительной молекулярной массой 55000-70000 Да и две легкие цепи (L-цепи) с менее протяженной последовательностью, содержащей приблизительно 210

аминокислотных остатков, и меньшей относительной молекулярной массой приблизительно 24000 Да. 110 аминокислот, расположенные ближе к N-концу, у разных тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов существенно различаются и известны как переменная область (переменная область, V-область), а остальная аминокислотная последовательность, расположенная ближе к C-концу, относительно постоянна, и ее называют константной областью (константная область, C-область). Переменная область тяжелой цепи составляет приблизительно одну четверть всей последовательности тяжелой цепи, а константная область составляет приблизительно три четверти. IgG имеют три константные области тяжелой цепи, называемые CH1, CH2 и CH3. Константная область является как скелетом молекулы иммуноглобулина, так и одним из сайтов активации иммунного ответа. В настоящем изобретении константная область включает область, в которой первые полипептиды взаимодействуют со вторыми полипептидами, содержащую аминокислоты, расположенные в домене CH3. Эти аминокислоты включают, без ограничения, глутамин³⁴⁷, тирозин³⁴⁹, треонин³⁵⁰, лейцин³⁵¹, серин³⁵⁴, аргинин³⁵⁵, аспарагиновую кислоту³⁵⁶, глутаминовую кислоту³⁵⁷, лизин³⁶⁰, серин³⁶⁴, треонин³⁶⁶, лейцин³⁶⁸, лизин³⁷⁰, аспарагин³⁹⁰, лизин³⁹², треонин³⁹⁴, пролин³⁹⁵, валин³⁹⁷, аспарагиновую кислоту³⁹⁹, серин⁴⁰⁰, фенилаланин⁴⁰⁵, тирозин⁴⁰⁷, лизин⁴⁰⁹ и лизин⁴³⁹.

При использовании здесь термины «очищенное» или «выделенное» антитело, пептид, полипептид или белок могут относиться к пептиду, полипептиду или белку, который был отделен от других белков, липидов и нуклеиновых кислот, с которыми он связан естественным образом. Полипептид/белок может составлять по меньшей мере 10% (то есть любой процент от 10% до 100%, например, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% и 99%) сухой массы очищенного препарата. Степень чистоты может быть измерена любым подходящим стандартным методом, например, хроматографией на колонках, электрофорезом в полиакриламидном геле или HPLC-анализом.

При использовании здесь термин «scFv» может относиться к одноцепочечному переменному фрагменту. scFv представляет собой слитый белок переменных областей тяжелой (VH) и легкой цепей (VL) иммуноглобулина, соединенных линкерным пептидом. Длина линкерного пептида может составлять от приблизительно 5 до 40 аминокислот или от приблизительно 10 до 30 аминокислот или приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 аминокислот. Типичным линкером является GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:72).

Термины «специфичное связывание», «селективное связывание», «селективно связывается» и «специфично связывается» могут относиться к антителу, связывающемуся

с эпитопом predetermined антигена, но не с другими антигенами. Обычно антитело связывается с равновесной константой диссоциации (K_D) приблизительно менее 10^{-6} М, например, приблизительно менее 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или еще меньше, при ее определении, например, равновесным диализом или технологией поверхностного плазмонного резонанса (surface plasmon resonance, SPR) в приборе для поверхностного плазмонного резонанса BIACORE[®] 2000 с использованием predetermined антигена, например, эпитопа Her2, PD-L1, Троп-2, CD3 и/или CD20, в качестве аналита и антитела в качестве лиганда, или в анализе связывания антитела с антиген-положительными клетками методом Скэтчарда, и (ii) связывается с predetermined антигеном с аффинностью, по меньшей мере в два раза превышающей аффинность его связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеин), отличным от predetermined антигена или близкородственного антигена.

При использовании здесь термины «субъект» или «пациент» могут относиться к биологической системе, подлежащей лечению. Биологическая система может включать, например, отдельную клетку, группу клеток (например, клеточная культура), орган, ткань или многоклеточный организм. Субъект по настоящему изобретению может включать птиц, рептилий, млекопитающих и тому подобное. Предпочтительно, млекопитающее включает грызунов и приматов, включая человека.

При использовании здесь термины «осуществление лечения» или «лечение» заболевания могут относиться к исполнению протокола, который может включать введение одного или более чем одного лекарственного средства пациенту (являющемуся человеком или не являющемуся человеком) в попытке положительным образом изменить признаки или симптомы заболевания. Положительное изменение возможно как до появления признаков или симптомов заболевания, так и после их появления. Таким образом, «осуществление лечения» или «лечение» включает «осуществление предотвращения» или «предотвращение» заболевания. Кроме того, «осуществление лечения» или «лечение» не требует полного облегчения признаков или симптомов, не требует излечения и прямо включает протоколы, которые могут оказывать на пациента лишь частичный эффект.

При использовании здесь термин «вариант Fc-области» относится к аминокислотной последовательности, отличающейся от нативной последовательности Fc-области (или ее частей) по меньшей мере одной аминокислотной модификацией (например, заменой, вставкой или делецией), включая гетеродимерные варианты, в которых последовательности тяжелых цепей-субъединиц могут отличаться друг от друга.

Типичные аминокислотные модификации по настоящему изобретению включают T366L, D399R, L351E, Y407L и/или K409V в области СНЗ.

Если контекстом ясно не продиктовано иное, при использовании здесь и в приложенной формуле изобретения формы единственного числа включают множественное число.

Термин «приблизительно» относится к диапазону значений, которые специалист в данной области не будет рассматривать как существенно отличающиеся от исходных значений. Например, термин «приблизительно» может относиться к значению, отличающемуся от заявленного значения не более чем на 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% или 0,01%, а также значения, перекрывающиеся с этими заявленными значениями, что будет определяться контекстом.

При использовании здесь термин «связывающий (связывающийся) элемент» относится к агенту, например, белку или белковому комплексу (такому как антитело или его фрагмент), малой молекуле и тому подобному, специфично связывающемуся с мишенью, такой как Fc-рецептор. Элемент, специфично связывающийся с Fc-рецептором, относится к агенту, который специфично связывается с Fc-рецептором. Термины «специфичное связывание», «специфично связывается» и тому подобные относятся к предпочтительному связыванию с одной молекулой в сравнении с другими молекулами или группировками в растворе или реакционной смеси. В некоторых воплощениях аффинность связывающего элемента в отношении мишени, с которой он специфично связывается, характеризуется K_d (константа диссоциации) 10^{-6} М или менее, такой как 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М или менее.

При использовании здесь термин «распознающие группировки» относится к областям агента, способным специфично взаимодействовать с молекулами-мишенями (например, антигенами, лигандами, рецепторами, субстратами) с высокой степенью селективности. Типичные распознающие группировки включают вариабельную область антитела, структурный вариант вариабельной области антитела, связывающий домен рецептора, связывающий домен лиганда или связывающий домен фермента. В настоящем изобретении распознающую группировку определяют как когнатную распознающую группировку цепи, с которой она связана. Природа этой связи может быть ковалентной или нековалентной, в зависимости от контекста и окружения. Например, биспецифичное гетеродимерное антитело по настоящему изобретению имеет распознающие группировки, ковалентно связанные с их соответствующими цепями, в то время как связь полумера такого биспецифичного антитела, в условиях, являющихся в достаточной мере

восстанавливающими, с соответствующей цепью может быть по меньшей мере частично нековалентной.

При использовании здесь термин «физиологическое условие» или «физиологические условия» относится к условию или условиям окружающей среды, которые могут встречаться в природе в организме или клеточной системе, или условию, при котором некоторые характеристики (например, температура) могут выходить за пределы диапазона значений, наблюдаемых в живом организме, но, тем не менее, позволяют биспецифичному гетеродимерному антителу по изобретению в некоторой степени выполнять свои функции. Неограничивающим примером физиологических условий являются температура, ионная сила, pH и концентрация ионов (например, Ca^{2+} или Mg^{2+}), обычно наблюдаемые внутри или вблизи клетки, такой как клетка млекопитающего. Температура в диапазоне приблизительно 2-40°C (например, 20-40°C), атмосферное давление приблизительно 1, pH приблизительно 6-8, концентрация глюкозы приблизительно 1-20 мМ, концентрация кислорода, приблизительно соответствующая его концентрации в атмосфере, и земное притяжение также являются примерами физиологических условий. При использовании здесь для описания условий этот термин можно также сочетать с другими конкретными ограничениями. Следует понимать, что в таких случаях этот термин необходимо правильно интерпретировать с учетом контекста описываемых таким образом условий. Например, описание водного раствора как соответствующего физиологическим условиям и в достаточной степени восстанавливающего, например, содержащего 1 мМ дитиотреитола, такого как забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS) при 2-4°C с 1 мМ дитиотреитола, не подразумевает, что весь этот раствор позволяет антителу выполнять свои функции даже в присутствии восстановителя, но подразумевает, что, помимо дитиотреитола, остальные элементы или характеристики раствора это позволяют.

При использовании здесь термин «по существу свободный» относится к уровням определенного компонента, такого как полипептид, не поддающимся выявлению с применением рутинных методов и протоколов выявления, известных специалисту в данной области, таких как вестерн-блот, ELISA, RIA, HPLC (включая хиральную HPLC, хиральную HPLC/MS, LC/MS/MS и так далее), тонкослойная хроматография, масс-спектрометрия, поляриметрические измерения, газовая хроматография – масс-спектрометрия или другие.

Публикации, раскрытые здесь, приведены исключительно в силу их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Ничто из приведенного здесь не следует толковать как

признание того, что настоящее изобретение не предшествует таким публикациям. Кроме того, приведенные даты публикаций могут отличаться от фактических дат публикации, которые могут нуждаться в независимом подтверждении.

Все публикации и патенты, на которые в данном тексте сделана ссылка, а также все документы или справочные материалы, патентные или непатентные литературные источники, на которые сделаны ссылки в каждой из этих заявок и патентов (в том числе при рассмотрении заявок на каждый выданный патент; «документы, на которые сделана ссылка в материалах заявки»), и все международные и локальные заявки или патенты, соответствующие и/или притязающие на приоритет любой из этих заявок или патентов, и все документы, на которые ссылаются документы, на которые сделана ссылка в материалах заявки, в прямой форме и полностью включены сюда посредством ссылки. В более общей форме, в данном тексте, в перечне ссылок перед формулой изобретения или в самом тексте, есть ссылки на документы и источники, и все эти документы или источники («источники, на которые здесь сделана ссылка»), а также все документы и источники, на которые ссылаются источники, на которые здесь сделана ссылка (включая любые производственные спецификации, инструкции и так далее), в прямой форме включены сюда посредством ссылки.

Для дальнейшего описания настоящего изобретения приведены следующие неограничивающие примеры.

VII. ПРИМЕРЫ

Пример 1 – Скрининг мутационных сайтов для получения гетеродимеров

В область домена СНЗ тяжелой цепи IgG1 были введены мутации, стимулирующие образование гетеродимеров. Анализ аминокислот, имеющих наибольшее значение при взаимодействии двух гомологичных доменов СНЗ IgG1 (обозначаемых далее СНЗ-А и СНЗ-В), проводили, как описано в J. Biol. Chem. 2010, 285:19637-19646, полностью включенной сюда посредством ссылки. В Банке данных белковых структур (Protein Data Bank, PDB) были найдены 27 последовательностей антител и в них были выбраны аминокислоты, исходя из критериев, основанных на контактном методе, в котором соприкасающиеся остатки определяют как остатки, у которых тяжелые атомы боковых цепей расположены на расстоянии менее установленного лимита 4,5 Å (0,45 нм) от тяжелых атомов любых остатков второй цепи.

Был проведен дополнительный скрининг аминокислот, расположенных на линии соприкосновения доменов СНЗ, заменой их на аланин с определением изменений энергии диссоциации и разворачивания при денатурации гидрохлоридом гуанидина для отбора

аминокислот, оказывавших наибольшее влияние на эту энергию в сравнении с диким типом. Результаты продемонстрировали, что мутации в положениях Thr366, Leu368, Phe405, Tyr407, Lys409 приводили к изменению свободной энергии более чем на 2 ккал/моль (8,368 кДж/моль); см. также Biochemistry.1998 Jun 30;37(26):9266-73, полностью включенную сюда посредством ссылки. Расстояние между аминокислотами, расположенными на линии соприкосновения, было также проанализировано программным обеспечением PyMOL и DS, результаты представлены в **Таблице 1**. Выделение курсивом и подчеркивание указывает на наличие водородных связей между остатками. Исходя из расстояния между аминокислотами на линии соприкосновения и результатов сканирования аланиновыми мутациями, для стимуляции образования гетеродимеров были выбраны следующие мутационные сайты: Thr366, Asp399 в первом полипептиде / домене СНЗ и Leu351, Tyr407 и Lys409 во втором полипептиде / домене СНЗ.

Таблица 1. Расстояние между тяжелыми атомами на линии соприкосновения доменов СНЗ

Цепь А	Цепь В (единица измерения: Å (10^{-10} м))			
GLN 347	LYS 360 3,9			
TYR 349	SER 354 3,7	ASP 356 3,9	GLU 357 3,6	LYS 360 4,1
THR 350	SER 354 3,8	ARG355 5,9		
<u>LEU 351</u>	LEU 351 4,1	SER 354 3,6	<u>THR 366 3,8</u>	
SER 354	TYR 349 4,1	THR 350 3,8	LEU 351 3,8	
ARG 355	THR 350 5,9			
<u>ASP 356</u>	TYR 349 3,9	<u>LYS 439 2,8</u>		
GLU 357	TYR 349 3,7	LYS 370 4,2		
LYS 360	GLN 347 3,8	TYR 349 4,1		
SER 364	LEU 368 3,9	LYS 370 3,9		
<u>THR 366</u>	LEU 351 3,7	<u>TYR 407 2,9</u>		
LEU 368	SER 364 3,8	LYS 409 4,2		
LYS 370	GLU 357 3,9	SER 364 4,1		
<u>ASN 390</u>	<u>SER 400 3,5</u>			
LYS 392	ASP 399 3,6	SER 400 4,0	PHE 405 3,7	
THR 394	THR 394 3,7	VAL 397 4,1	PHE 405 4,0	TYR 407 4,3
PRO 395	VAL 397 3,9			

VAL 397	THR 394 4,0	PRO 395 4,0		
<u>ASP 399</u>	LYS 392 3,7	<u>LYS 409 2,8</u>		
<u>SER 400</u>	<u>ASN 390 3,2</u>	LYS 392 4,1		
PHE 405	LYS 392 3,5	THR 394 4,6	LYS 409 3,6	
<u>TYR 407</u>	<u>THR 366 2,7</u>	THR 394 4,3	TYR 407 3,9	LYS 409 3,4
<u>LYS 409</u>	LEU 368 4,0	<u>ASP 399 2,8</u>	PHE 405 4,0	TYR 407 3,6
<u>LYS 439</u>	<u>ASP 356 2,9</u>			

Пример 2 – Конструирование библиотеки для дисплея Fc-гетеродимера на эукариотических клетках

2.1. Конструирование дисплейного вектора для Fc-гетеродимера

Дисплейный вектор для Fc-гетеродимера pDis3 был получен модификацией дисплейного вектора pDisplay (Invitrogen, каталожный номер V66020). Его ген PDGFR и ген *тус* были удалены расщеплением NotI (NEB, каталожный номер R-0189S) / SfiI (NEB, каталожный номер R-0123S). MCS (Multiple Cloning Site, множественный сайт клонирования) получали амплификацией плазмиды вектора pDisplay с использованием следующих праймеров: TGGGGCCCAGCCGGCCAGATCT (SEQ ID NO:1) и ATAAGAATGCGGCCGCGTCGACCTGCA (SEQ ID NO:2). Эти праймеры имеют сайты рестрикции NotI/SfiI, соответственно. Было проведено расщепление MCS по сайтам рестрикции NotI/SfiI и его вставка в указанный выше расщепленный вектор. Это привело к получению промежуточного продукта – вектора pDis.

В pDis удаляли ген F1 *ori* и вводили ген *Orip* с применением следующего метода. Ген *Orip* амплифицировали из вектора pTT5 (Biovetor, каталожный номер 3574108) с использованием следующих праймеров, содержащих сайт рестрикции SspI (NEB, каталожный номер R1032S): 5'-ATCGAGTCAATATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTAAGGAAC (SEQ ID NO:3), 5'-CAGTCGATAATATTAAGAATTAATTCTCATGTTTGACAGCTTAT (SEQ ID NO:4). Затем ген *Orip* расщепляли с использованием SspI и лигировали с вектором pDis, расщепленным SspI. Это приводило к получению вектора pDis1. Затем из вектора pDis1 удаляли ген резистентности *neo* посредством расщепления с использованием AvrII (NEB, каталожный номер R0174S). Ген резистентности *hygro* вводили амплификацией pCEP4 (Invitrogen, каталожный номер V04450) со следующими праймерами для включения сайта рестрикции AvrII: прямой праймер 5'-TAGCCTCCCCCTAGGGTGGGCGAAGAАCTCCAGCATG (SEQ ID NO:5), 5'-

TTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAGATCGATCAAGAGACAGGATGAGGA

(SEQ ID NO:6). После расщепления ген *hygro* вводили в вектор pDis1 с получением вектора pDis2.

ДНК-последовательность (SEQ ID NO:7) была синтезирована компанией «GENEWIZ», Китай. Эта последовательность содержит, слева направо, ген SUMO (из вектора Champion™ pET SUMO, Invitrogen, каталожный номер K30001), человеческий ген Fc (обозначаемый далее Fc1, содержащий домен CH3-A), сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH), ген сигнального пептида (из вектора pDisplay), ген гемагглютинина (HA) вируса гриппа человека (Genbank: NC_007362.1, аминокислоты №№98-106) и человеческий ген Fc (обозначаемый далее Fc2, содержащий домен CH3-B). На противоположных концах всей последовательности генов расположены два сайта рестрикции SfiI и PstI. Последовательность Fc, последовательность SUMO и последовательность HA были оптимизированы с учетом кодонов, наиболее распространенных у млекопитающих. Домен Fc1 имеет сайты рестрикции BgIII/SacII, а домен Fc2 имеет сайты рестрикции BsrGI/SaII. Сайты рестрикции не меняют аминокислотные последовательности Fc. Последовательности ДНК и pDis2 расщепляли с использованием SfiI/PstI и затем лигировали в pDis2 с получением конечного вектора pDis3, как показано на **ФИГ. 1**.

2.2. Конструирование библиотеки гетеродимерных Fc

pUC57-TCZHC (GENEWIZ, Китай) содержал последовательности природных человеческих Fc. Первые сайт-направленные случайные последовательности Fc были получены амплификацией pUC57-TCZHC с использованием вырожденных праймеров, в которых вырожденный кодон NNS, кодирующий аминокислоты в положении 366 и положении 399 Fc1, приводил к их случайной замене на естественные аминокислоты 20 различных типов. Прямой праймер представлял собой TCCCAGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGTCTCCCTCENNSTGCCTGGTCAAGG GATTCTACCCTTC (SEQ ID NO:8), а обратный праймер представлял собой GTCCACGGTGAGCTTGGAGTACAGGAAGAAGGATCCGTCGCTSNACAGGACGGGGG GGGTTGTCTT (SEQ ID NO:9).

Второй ген Fc был амплифицирован из pUC57-TCZHC с использованием следующих праймеров: прямой праймер представлял собой TACTCCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC (SEQ ID NO:10), а обратный праймер представлял собой

CGATCCAATCGATGGAAGATCTTCATCATTTGCCGGGGCTGAGGCTCAGGCT
(SEQ ID NO:11).

Для получения полноразмерного сайт-направленного случайного Fc1-фрагмента были использованы следующие перекрывающиеся праймеры: 5'-CAAGGGCCAGCCGCGGGAACCTCAAGTGTATACCTCCCTCCCAGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAA (SEQ ID NO:12), 5'-CGATCCAATCGATGGAAGATCTTCATCATTTGCCGGGGCTGAGGCTCAGGCT (SEQ ID NO:13).

Fc1-фрагмент субклонировали в вектор pDis3 с использованием сайтов рестрикции BglII (NEB, каталожный номер R0144S) и SacII (NEB, каталожный номер R0157S). Затем полученной обессоленной конструкцией трансформировали штамм *E. coli* Top10 с использованием аппарата для электропорации клеток Bio-Rad Gene Pulser X.

Полученные трансформанты высевали непосредственно на селективную агаровую среду, содержащую 100 мг/л ампициллина. Размер мутантной библиотеки рассчитывали по числу колоний. Случайным образом отбирали 20 колоний и введение разных мутаций верифицировали секвенированием ДНК. Конструирование библиотеки сайт-направленных случайных мутантных Fc1 повторной электропорацией продолжали до достижения размера 10^5 .

Для выделения библиотеки сайт-направленных случайных мутантных Fc1 использовали набор для выделения плазмид (Qiagen, каталожный номер 27106). Полученную библиотеку использовали в качестве матрицы для конструирования библиотеки сайт-направленных случайных мутантных Fc1+Fc2. Сайт-направленный случайный Fc2-фрагмент клонировали в библиотеку Fc1 с использованием вырожденных праймеров, добавляя сайты рестрикции BsrGI и SalI со стороны 5'- и 3'-конца, соответственно:

5'-GGCCAGCCCAGGGAACCTCAAGTGTACACCNSCCTCCCAGCCGGGATGAGCTG, (SEQ ID NO:14),

5'-GCCCTGTTGCCACCGGCTCTTGTCGACGGTGAGSNNGGASNNCAGGAAGAAGGATCCGTCGCT (SEQ ID NO:15).

В этих праймерах присутствуют сайты BsrGI и SalI, и данный метод приводил к введению 20 аминокислот в положения 351, 407 и 409 Fc с использованием кодона NNS. Проводили со-трансформацию штамма *E. Coli* Top10 Fc2-фрагментом и линейаризованным вектором Fc2 (расщеплением с использованием BsrGI (NEB, каталожный номер R3575L) и

SalI (NEB, каталожный номер R3138L)) с использованием аппарата для электропорации клеток Bio-Rad Gene Pulser X.

Полученные трансформанты высевали непосредственно на селективную агаровую среду, содержащую 100 мг/л ампициллина. Конструирование библиотеки сайт-направленных случайных мутантов Fc1+Fc2 повторной электропорацией продолжали до достижения размера 3×10^8 . Методика конструирования библиотеки гетеродимерных Fc представлена на **ФИГ. 2**. Плазмиды библиотеки Fc1+Fc2 выделяли с использованием наборов QIAGEN Plasmid Plus 96 (Qiagen, каталожный номер 16181), случайно выбирая колонии с селективной агаровой среды.

Очищенными плазмидами трансфицировали клетки FreeStyle™ 293-F (Invitrogen, каталожный номер R79007) в 96-луночном планшете. В день, предшествующий трансфекции, клетки 293-F субкультивировали и размножали, давая им расти в течение ночи. В день трансфекции клетки собирали центрифугированием и ресуспендировали с использованием свежей экспрессионной среды FreeStyle™ 293 (Gibco, каталожный номер 12338001) до конечной плотности 200×10^5 жизнеспособных клеток на мл. Проводили транзиторную со-трансфекцию полученными плазмидами (конечная концентрация 36,67 мкг/мл) в указанных молярных отношениях с полиэтиленимином (25 кДа, конечная концентрация 55 мкг/мл, Alfa Aesar, каталожный номер 43896) с их смешиванием и инкубацией при 37°C в течение 1 часа. Добавляли свежую среду в количестве 19 объемов трансфекционной смеси и продолжали инкубацию. Супернатант клеточной культуры собирали через 5-6 дней после трансфекции.

Как показано на **ФИГ. 3**, в супернатанте присутствовали 5 структурных типов гетеродимерных Fc с двумя разными метками. Гетеродимеры выявляли посредством ELISA. Кратко, на 96-луночный планшет сорбировали антитело против HA (Abcam, каталожный номер ab181181) в карбонатном буфере, pH 9,6, и промывали с использованием PBST (Sigma, каталожный номер P-3563). Все неспецифические сайты связывания на поверхности планшета блокировали посредством PBST, содержащего 5% снятого молока. Планшет промывали с использованием PBST. Супернатант разводили в PBST, содержащем 1% BSA, и вносили в планшет, проводя инкубацию при 25°C в течение 1 часа. Планшет промывали с использованием PBST для удаления несвязанного образца. Антитело против SUMO (Abcam, каталожный номер ab179907), меченное биотином, разводили в PBST, содержащем 5% снятого молока, и вносили в планшет, после чего проводили инкубацию при 25°C в течение 1 часа. Планшет промывали с использованием PBST. Затем вторичное антитело, стрептомицин авидин, меченный

пероксидазой хрена (Abscam, каталожный номер 59653), разводили в PBST, содержащем 5% снятого молока, и вносили в планшет, после чего проводили инкубацию при 25°C в течение 1 часа. Планшет промывали с использованием PBST. Вносили TMB (BD OptEIA, каталожный номер 555214) для появления окраски под действием фермента на 10 минут. Для остановки окрашивания вносили 1 М H₂SO₄. Поглощение при 450 нм определяли с использованием устройства для прочтения микропланшетов.

В каждом раунде скрининга отбирали по 20 клонов с наибольшими значениями OD и размножали соответствующие клетки в 96-луночном планшете. Белки очищали из культуральных супернатантов с применением хроматографии на агарозе с белком А (ACRO Biosystems, каталожный номер MA0422-S1) и анализировали посредством SDS-PAGE. После многих раундов скрининга получали клон с наибольшим выходом гетеродимеризации, который верифицировали секвенированием ДНК. Результаты показаны в **Таблице 2** ниже. Аминокислотные последовательности положительных клонов показаны в SEQ ID NO:16-31.

Таблица 2. Результаты секвенирования Fc1 и Fc2

	Fc1			Fc2				Доля гетеродимера (SDS-PAGE, с применением Quantity One)
	366	399	SEQ ID NO:	351	407	409	SEQ ID NO:	
№1	L	C	SEQ ID NO:16	G	L	C	SEQ ID NO:17	61,45
№6	L	C	SEQ ID NO:18	Y	A	P	SEQ ID NO:19	57,59
№23	V	T	SEQ ID NO:20	K	T	Q	SEQ ID NO:21	52,13
№41	L	A	SEQ ID NO:22	W	H	R	SEQ ID NO:23	52,33
№46	P	N	SEQ ID NO:24	V	P	S	SEQ ID NO:25	47,77
№53	P	I	SEQ ID NO:26	P	F	F	SEQ ID NO:27	42,97
№65	W	G	SEQ ID NO:28	D	P	S	SEQ ID NO:29	47,30
№76	L	R	SEQ ID NO:30	E	L	V	SEQ ID NO:31	69,73

Пример 3 – Конструирование вектора для экспрессии гетеродимерных антител

Были сконструированы векторы экспрессии X0GC, кодирующие тяжелую цепь и легкую цепь антитела против HER2, последовательности переменных областей которого были взяты с <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00072>. Был использован константный домен тяжелой цепи человеческого IgG1 (Fc1). Нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную легкую цепь (V_L), представляла собой SEQ ID NO:32, и соответствующая

аминокислотная последовательность представляла собой SEQ ID NO:33. Нуклеотидная последовательность, кодирующая константный домен легкой цепи (C_L), представляла собой SEQ ID NO:34, и соответствующая аминокислотная последовательность представляла собой SEQ ID NO:35. Нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную тяжелую цепь (V_H), представляла собой SEQ ID NO:36, и соответствующая аминокислотная последовательность представляла собой SEQ ID NO:37. Нуклеотидная последовательность, кодирующая константную тяжелую цепь (C_H), представляла собой SEQ ID NO:38, и соответствующая аминокислотная последовательность представляла собой SEQ ID NO:39.

V_L , C_L , V_H , C_H амплифицировали полимеразной цепной реакцией (ПЦР), как описано далее. Реакционная система представляла собой следующее: H_2O , 8,9 мкл; 5× буфер для ДНК-полимеразы Phusion, 4 мкл; 1 мМ dNTP, 4 мкл; прямой праймер, 1 мкл; обратный праймер, 1 мкл; ДНК-полимераза Phusion (NEB, каталожный номер F-530L), 0,1 мкл; и матрица, 1 мкл. Продукты ПЦР переменных и константных фрагментов разделяли электрофорезом в 1,5%-м агарозном геле и выделяли с использованием набора для очистки ДНК (Promega, каталожный номер A9282). Следующий раунд ПЦР проводили с использованием выделенных переменных и константных фрагментов в качестве матриц в сочетании с прямыми праймерами переменных фрагментов и обратными праймерами константных фрагментов. После выделения продуктов получали полноразмерные фрагменты легкой цепи или тяжелой цепи. Полученные фрагменты и вектор X0GC расщепляли и связывали друг с другом по одинаковым сайтам рестрикции EcoRI (NEB, каталожный номер R3101L) / HindIII (NEB, каталожный номер R3104L). Система расщепления представляла собой следующее: 10× реакционный буфер, 32 мкл; EcoRI и HindIII, 0,5 мкл; расщепляемые фрагменты, 3 мкл; H_2O , 14,5 мкл. Взаимодействие проводили при 37°C в течение 3 часов. Система лигирования представляла собой следующее: 10× буфер для ДНК-лигазы T4, 2 мкл; ДНК-лигаза T4 (New England Biolabs, каталожный номер M0202V), 0,5 мкл; лигируемые фрагменты, 3 мкл; лигируемый вектор, 3 мкл; H_2O , 11,5 мкл. Взаимодействие проводили при комнатной температуре в течение 12 часов. Полученными конструкциями трансформировали штамм *E. Coli* DH5α (TIANGEN, каталожный номер CB104, Китай), после чего получали плазмиду с тяжелой цепью (Fc1) или легкой цепью антитела для экспрессии в эукариотической клетке.

Были сконструированы векторы экспрессии X0GC, кодирующие тяжелую цепь антитела против HER2. Последовательность константной области тяжелой цепи представляла собой последовательность IgG1 (Fc2) (SEQ ID NO:40). Аминокислотная

последовательность представляла собой SEQ ID NO:41. Экспрессионную плазмиду тяжелой цепи антитела использовали для экспрессии тяжелой цепи антитела (Fc2) у эукариот.

Были сконструированы векторы экспрессии X0GC, кодирующие тяжелую цепь и легкую цепь антитела против CD20. Варибельные последовательности антитела были взяты из US 5736137, полностью включенной сюда посредством ссылки. Последовательности константной области тяжелой цепи были взяты из человеческого IgG1 (Fc1). Нуклеотидная последовательность, кодирующая варибельную легкую цепь (V_L), представляла собой SEQ ID NO:42, и соответствующая аминокислотная последовательность представляла собой SEQ ID NO:43. Аминокислотная последовательность константной легкой цепи (C_L) представляла собой SEQ ID NO:35. Нуклеотидная последовательность, кодирующая варибельную тяжелую цепь (V_H), представляла собой SEQ ID NO:44, и соответствующая аминокислотная последовательность представляла собой SEQ ID NO:45. Нуклеотидная последовательность, кодирующая константную тяжелую цепь (C_H), представляла собой SEQ ID NO:46 или 47, соответствующая аминокислотная последовательность представляла собой SEQ ID NO:48 или 49. Вектор экспрессии получали, как описано выше. Экспрессионную плазмиду тяжелой цепи или легкой цепи антитела использовали для экспрессии тяжелой цепи (Fc1 или Fc2) или легкой цепи у эукариот.

Были сконструированы векторы экспрессии X0GC, кодирующие тяжелую цепь и легкую цепь антитела против Tgp-2, как описано выше. Варибельные последовательности антитела были взяты из WO 2003/074566, полностью включенной сюда посредством ссылки. Последовательность константной тяжелой цепи представляла собой последовательность человеческого IgG1 (Fc1). Нуклеотидная последовательность, кодирующая варибельную легкую цепь (V_L), представляла собой SEQ ID NO:50, и аминокислотная последовательность представляла собой SEQ ID NO:51. Аминокислотная последовательность константной легкой цепи (C_L) представляла собой SEQ ID NO:35. Нуклеотидная последовательность варибельной тяжелой цепи (V_H), представляла собой SEQ ID NO:52, и соответствующая аминокислотная последовательность представляла собой SEQ ID NO:53. Нуклеотидная последовательность, кодирующая константную тяжелую цепь (C_H), представляла собой SEQ ID NO:54, аминокислотная последовательность представляла собой SEQ ID NO:55.

Были сконструированы векторы экспрессии X0GC, кодирующие тяжелую цепь и легкую цепь антитела против PD-L1, как описано выше. Варибельные

последовательности антитела были взяты из US 2010/0203056, полностью включенной сюда посредством ссылки. Последовательности константной области тяжелой цепи были взяты из человеческого IgG1 (Fc1). Нуклеотидная последовательность варибельной легкой цепи представляла собой SEQ ID NO:56, аминокислотная последовательность варибельной легкой цепи представляла собой SEQ ID NO:57, аминокислотная последовательность константной легкой цепи представляла собой SEQ ID NO:35, нуклеотидная последовательность варибельной тяжелой цепи представляла собой SEQ ID NO:58, аминокислотная последовательность варибельной тяжелой цепи представляла собой SEQ ID NO:59, нуклеотидная последовательность константной тяжелой цепи представляла собой SEQ ID NO:60, и аминокислотная последовательность константной тяжелой цепи представляла собой SEQ ID NO:61.

Были сконструированы векторы экспрессии X0GC, кодирующие слитую последовательность scFv против CD3 и человеческого IgG1 (Fc2), как описано выше. Варибельные последовательности антитела были взяты из US 7112324, полностью включенной сюда посредством ссылки. Последовательность константной области тяжелой цепи представляла собой последовательность человеческого IgG1 (Fc2). Нуклеотидная последовательность варибельного домена представляла собой SEQ ID NO:62, аминокислотная последовательность варибельного домена представляла собой SEQ ID NO:63, нуклеотидная последовательность константного домена представляла собой любую из SEQ ID NO:64-67, и аминокислотная последовательность константного домена представляла собой любую из SEQ ID NO:68-71. Экспрессионную плазмиду слитых последовательностей scFv против CD3 и человеческого IgG1 (Fc2) использовали для экспрессии слитых последовательностей scFv против CD3 и человеческого IgG1 (Fc2) у эукариот.

Пример 4 – Экспрессия гетеродимерных антител

Двумя векторами экспрессии тяжелой и легкой цепей антитела трансфицировали клетки FreeStyle™ 293-F (FreeStyle™ 293-F Cells, каталожный номер R79007, Invitrogen). В день, предшествующий трансфекции, клетки 293-F субкультивировали и размножали, давая им расти в течение ночи. В день трансфекции клетки собирали центрифугированием и ресуспендировали с использованием свежей экспрессионной среды FreeStyle™ 293 (Gibco, каталожный номер 12338001) до конечной плотности 200×10^5 жизнеспособных клеток на мл. Проводили транзиторную со-трансфекцию полученными плазмидами (конечная концентрация 36,67 мкг/мл) в указанных молярных отношениях с полиэтиленимином (25 кДа, конечная концентрация 55 мкг/мл, Alfa Aesar, каталожный

номер 43896) с их смешиванием и инкубацией при 37°C и 120 об/мин в течение 1 часа. Затем добавляли свежую среду в количестве 19 объемов трансфекционной смеси и продолжали инкубацию. Супернатант клеточной культуры собирали через 5-6 дней после трансфекции.

Клетки также трансфицировали тремя векторами экспрессии. Проводили совместную трансфекцию тяжелой цепью (Fc1 человеческого IgG1) антитела А, легкой цепью антитела А и слитыми последовательностями scFv антитела В' и Fc2 человеческого IgG1. В супернатанте клеточной культуры присутствовали гомодимер Fc1, гомодимер scFv-Fc2 и гетеродимер Fc1/scFv-Fc2. Гетеродимер Fc1/scFv-Fc2 был основным продуктом в силу эффекта взаимного отталкивания Fc1 и Fc2. Кроме того, Fc1 и Fc2 имеют выраженную тенденцию к образованию гетеродимеров.

По результатам ELISA, выходы Fc1 против HER2 и Fc2 против CD3 составили 70-100 мг/л. Перед очисткой на колонках супернатант фильтровали через 0,22 мкм фильтр при 4°C для удаления клеточного детрита.

Пример 5 – Очистка гетеродимерного антитела «антитело против HER2/scFv против CD3»

Общая структура гетеродимерного антитела «антитело против HER2/scFv против CD3» показана на **ФИГ. 4**. Белки очищали из культуральных супернатантов с использованием Protein-A Sepharose Fast Flow (внутренний диаметр 16 мм, 22 мл, GE Healthcare). Полученные белки концентрировали с использованием ультрацентрифужной пробирки (отсечение по молекулярной массе 10 кДа) и заменяли буфер на раствор PBS.

Затем добавляли 3 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до конечной концентрации 1 М с половиной объема раствора. Белки разводили буфером А (20 мМ фосфата натрия, 1 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, рН 7,0).

Также применяли описанную ниже очистку с использованием системы для очистки белка АКТА Explorer 100 (GE Healthcare). Белки очищали с использованием Source Phenyl (внутренний диаметр 16 мм, 22 мл, GE Healthcare). Образцы белка наносили на колонку, предварительно уравновешенную буфером А (20 мМ Na_3PO_4 , 1 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, рН 7,0). Скорость потока составляла 3 мл/мин. Затем колонку уравнивали буфером А и промывали 15 объемами колонки с градиентом от буфера А (0% В) до 100% буфера В (20 мМ фосфата натрия, рН 7,0) в течение 180 минут. Скорость потока составляла 2 мл/мин. Фракции, показанные на **ФИГ. 5**, объединяли, концентрировали с использованием ультрацентрифужной пробирки (отсечение по молекулярной массе

10 кДа) и заменяли буфер на раствор PBS. Белки фильтровали через 0,22 мкм и хранили при 4°C. Очищенный белок анализировали посредством SDS-PAGE. Результат показан на **ФИГ. 6**. По результатам эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SEC-HPLC), степень чистоты составила 97,65% (**ФИГ. 7**).

Пример 6 – Анализ стабильности гетеродимерного биспецифичного антитела «антитело против HER2/scFv против CD3»

Герметично закрытые образцы гетеродимера «антитело против HER2/scFv против CD3» (1 мг/мл и 10 мг/мл) хранили в инкубаторе при 40°C (BINDER, KBF240). Стабильность анализировали с использованием образцов объемом 20 мкл в разных временных точках (исходно (0 сутки), 1 сутки, 2 сутки, 5 сутки, 7 сутки) с применением высокоэффективной эксклюзионной жидкостной хроматографии (SEC-HPLC). Условия SEC-HPLC были следующими: (1) хроматографическая колонка: TSKgel G3000SWxl (Tosoh Bioscience), 5 мкм, 7,8 мм×30 см; (2) подвижная фаза: 5 mM PBS, 150 mM NaCl, pH 6,7; (3) скорость потока: 0,6 мл/мин; (4) длина волны при УФ-детекции: 280 нм; (5) время экспозиции: 30 мин. Используемый прибор представлял собой хроматограф Agilent 1200 Infinity, а для построения диаграмм и расчета доли остаточного мономера применяли ChemStation Agilent. Как показано на **ФИГ. 8**, в условиях эксперимента при 40°C, гетеродимер «антитело против HER2/scFv против CD3» не был подвержен существенной агрегации. Полученные данные продемонстрировали, что гетеродимер «антитело против HER2/scFv против CD3» обладает хорошей температурной стабильностью.

Пример 7 – Связывающая активность гетеродимерного биспецифичного антитела «антитело против HER2/scFv против CD3» в отношении FcRn

Активность связывания FcRn гетеродимером «антитело против HER2/scFv против CD3» анализировали посредством ELISA. Кратко, на планшет для ELISA сорбировали гетеродимер «антитело против HER2/scFv против CD3» и контрольные образцы в карбонатном/бикарбонатном буфере (pH 9,6) в течение ночи при 4°C. Планшет промывали 5 раз с использованием PBST (pH 6,0). В каждую лунку добавляли по 300 мкл PBST, содержащего 0,5% BSA, для блокировки планшета и планшет инкубировали по меньшей мере 1 час при 25°C. Планшет промывали, как описано выше, затем в каждую лунку вносили по 100 мкл FcRn с his-меткой (Sino Biological, каталожный номер СТ009-H08H), 1 мкг/мл, разведенный в 0,5% BSA в PBST, и планшет инкубировали в течение 2 ч при 25°C. Планшет промывали, как описано выше, затем в каждую лунку вносили по 100 мкл мышинового антитела против his (CWБИО, каталожный номер CW0228), разведение 1:5000 в

0,5% BSA в PBST, и проводили инкубацию в течение 1 ч при 25°C. Планшет промывали, как описано выше, затем в каждую лунку вносили по 100 мкл антитела против мышинового IgG (Abscam, каталожный номер AB7068), меченного пероксидазой хрена (HRP), и проводили инкубацию в течение 1 ч при 25°C. Планшет промывали, как описано выше, в каждую лунку вносили по 100 мкл TMB и проводили окрашивание в течение 10 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали, добавляя в каждую лунку по 100 мкл 1 М H₂SO₄. Оптическую плотность при 450 нм определяли с использованием устройства для прочтения микропланшетов. Как показано на **ФИГ. 9**, гетеродимер «антитело против HER2/scFv против CD3» связывается с FcRn.

Пример 8 – Связывающая активность гетеродимерного биспецифичного антитела «антитело против HER2/scFv против CD3» in vitro

Гетеродимер «антитело против HER2/scFv против CD3» анализировали проточной цитометрией (FACS) на предмет связывающей активности в отношении клеток SK-BR-3 с высокой экспрессией HER2 и клеток Jurkat с высокой экспрессией CD3.

Клетки SK-BR-3 и клетки Jurkat собирали и промывали один раз холодным аналитическим буфером, представляющим собой холодный PBS (GIBCO, каталожный номер 14190-235), содержащий 2% FBS (Hyclone, каталожный номер SH30084.03), соответственно. Затем аликвоты клеток SK-BR-3 (1×10^6 на пробирку) ресуспендировали в холодном аналитическом буфере (200 мкл DPBS, содержащего 2% FBS) и инкубировали с 0,5 нМ гетеродимера «антитело против HER2/scFv против CD3», или гомодимерного тетравалентного антитела против HER2/CD3, или антитела против HER2, или изотипического контроля (человеческий иммуноглобулин, Jiangxi Boya Bio-Pharmaceutical, разрешение №S19993012, Китай) на льду в темноте в течение 30 минут. Аликвоты клеток Jurkat обрабатывали сходным образом, за исключением того, что концентрация этих образцов была изменена на 5 нМ. По окончании инкубации клетки промывали два раза холодным аналитическим буфером, затем ресуспендировали в холодном аналитическом буфере и инкубировали с разведенным в 50 раз конъюгатом антитела против человеческого IgG с FITC (ZSGB-Bio, каталожный номер ZF0306, Китай) на льду в темноте в течение 30 минут. По окончании инкубации клетки промывали два раза холодным аналитическим буфером и затем ресуспендировали в холодном PBS. Проточную цитометрию проводили с использованием FACS Calibur (Becton Dickinson). Результаты представлены в **Таблицах 3 и 4**. Полученные результаты продемонстрировали, что гетеродимерная конструкция «антитело против HER2/scFv против CD3» связывала свои антигены HER2 и CD3 с хорошей активностью.

Таблица 3. Связывающая активность в отношении клеток SK-BR-3 с высокой экспрессией HER2

Образец	Средняя интенсивность флуоресценции (Mean Fluorescence Intensity, MFI)
Изотипический контроль	2,88
Антитело против HER2 (герцептин)	20,55
Гетеродимер «антитело против HER2/scFv против CD3»	14,16

Таблица 4. Связывающая активность в отношении клеток Jurkat с высокой экспрессией CD3

Образец	MFI
Изотипический контроль	3,16
Антитело против HER2 (герцептин)	3,16
Гетеродимер «антитело против HER2/scFv против CD3»	5,19

Пример 9 – Связывающая активность гетеродимерного биспецифического антитела «антитело против HER2/scFv против CD3» в отношении HER2 и CD3 одновременно

Гетеродимерные конструкции «антитело против HER2/scFv против CD3» анализировали посредством FACS на предмет связывающей активности в отношении HER2 и CD3 одновременно с использованием клеток SK-BR-3 и клеток Jurkat.

Клетки SK-BR-3 окрашивали, следуя инструкции по применению набора РКН26 (Sigma, каталожный номер SLBH4568V). Кратко, клетки SK-BR-3 собирали, промывали один раз в среде, свободной от сыворотки, затем готовили суспензию клеток SK-BR-3, 2×10^7 клеток/мл, и разводили РКН26 до 4 мкМ, соответственно, с использованием разбавителя С из набора РКН26. Затем их смешивали 1:1 с получением смеси, где плотность клеток составляла 1×10^7 клеток/мл, а концентрация РКН26 – 2 мкМ. После этого смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 1 минуты и затем инкубировали с равным объемом FBS в течение 1 минуты для остановки окрашивания. Затем смесь центрифугировали при 400 g в течение 10 минут, промывали два раза полной

средой, после чего ресуспендировали в полной среде. Клетки Jurkat окрашивали, следуя инструкции по применению набора CFSE (Life Technology, каталожный номер C34554). Кратко, CFSE разводили до рабочей концентрации 0,5 мкМ в PBS и предварительно нагревали до 37°C. Клетки Jurkat центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 минут, затем ресуспендировали в предварительно нагретом рабочем растворе CFSE и инкубировали при 37°C в течение 15 мин. Окрашенные клетки Jurkat центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 минут, затем ресуспендировали в полной среде и инкубировали в течение 30 мин. После инкубации клетки промывали один раз полной средой и затем ресуспендировали в полной среде.

Окрашенные выше клетки SK-BR-3 и клетки Jurkat собирали центрифугированием и промывали один раз холодным аналитическим буфером, представляющим собой холодный PBS, содержащий 2% FBS. Клетки ресуспендировали при плотности клеток 5×10^6 клеток/мл в холодном аналитическом буфере. Клетки SK-BR-3 и клетки Jurkat смешивали в соотношении 1:1 и в каждую пробирку пипеткой переносили аликвоты смесей по 100 мкл (конкретно, по $2,5 \times 10^5$ клеток SK-BR-3 и $2,5 \times 10^5$ клеток Jurkat). Затем добавляли по 100 мкл образцов гетеродимера «антитело против HER2/scFv против CD3» или изотипического контроля (человеческий иммуноглобулин, Jiangxi Boya Bio-Pharmaceutical, S19993012). Разведение в аналитическом буфере, конечная концентрация 5 нМ. Пробирки инкубировали в течение 30 минут на льду в темноте, промывали два раза холодным аналитическим буфером и затем ресуспендировали в 500 мкл холодного PBS. Проточную цитометрию проводили с использованием FACS Calibur.

Как показано на **ФИГ. 10**, гетеродимер «антитело против HER2/scFv против CD3» может индуцировать объединение клеток SK-BR-3 и Jurkat посредством одновременного связывания с клетками SK-BR-3 с высокой экспрессией HER2 и клетками Jurkat с высокой экспрессией CD3, и это означает, что гетеродимер может привлекать Т-клетки к опухолевым клеткам и приводить к повышению активности по уничтожению раковых клеток.

Пример 10 – Цитотоксичность гетеродимерного биспецифического антитела «антитело против HER2/scFv против CD3» в отношении опухолевых клеток in vitro

Клетки-мишени (BT-474 и SK-BR-3) собирали и ресуспендировали в полной среде (RPMI 1640, содержащей 10% FBS) при плотности клеток 2×10^5 клеток/мл. Клетки-мишени BT-474 и SK-BR-3 высевали в 96-луночные планшеты, 50 мкл на лунку (1×10^4 клеток на лунку), соответственно, после чего вносили серийно разведенные образцы гетеродимера «антитело против HER2/scFv против CD3» и контрольные образцы

с полной средой в количестве 100 мкл на лунку. Согласно предварительному эксперименту, отношение эффекторы/мишени (effect v.s. target, E/T) было определено как 20:1. Клетки-эффекторы (человеческие РВМС, Lonza, каталожный номер CC-2702) ресуспендировали в полной среде при плотности клеток 4×10^6 клеток/мл и затем высевали по 50 мкл в каждую лунку (2×10^5 клеток на лунку). Культуральный планшет инкубировали в течение 4 суток в CO₂-инкубаторе при 37°C. После инкубации отбирали супернатант и клетки промывали два раза с использованием 200 мкл DPBS для удаления эффекторных клеток. Добавляли 100 мкл полной среды и 20 мкл MTS и затем проводили инкубацию в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 2-3 часов. Поглощение при 490 нм (значение OD) определяли с использованием устройства для прочтения микропланшетов. Цитотоксичность рассчитывали следующим образом:

$$\text{цитотоксичность} = \frac{\text{OD}_{\text{контроль}} - \text{OD}_{\text{эксперимент}}}{\text{OD}_{\text{контроль}}}$$

Как показано на **ФИГ. 11**, гетеродимерная конструкция «антитело против HER2/scFv против CD3» уничтожала клетки рака молочной железы SK-BR-3 и BT-474 с высокой экспрессией HER2 зависимым от концентрации образом. Цитотоксичность этой конструкции была намного выше, чем у герцептина (mAb против HER2), демонстрируя высокую активность по уничтожению опухолевых клеток.

Пример 11 – Исследование фармакокинетики гетеродимерного биспецифичного антитела «антитело против HER2/scFv против CD3» у мышей

Фармакокинетику гетеродимера «антитело против HER2/scFv против CD3» исследовали у самок мышей BALB/c в возрасте 8 недель, приобретенных у Beijing HFK Bioscience Co., Ltd. После одной недели акклиматизации мышей случайным образом распределяли на две группы по 21 мыши в каждой. Мышам проводили однократную внутривенную инъекцию моноклонального антитела герцептина или гетеродимерного биспецифичного антитела «антитело против HER2/scFv против CD3», соответственно, в дозе 20 нмоль/кг. Образцы крови получали из ретроорбитального синуса в пробирки без антикоагулянта в следующих временных точках: перед введением, через 1, 3, 6, 10, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 216, 264, 312 ч после введения. У каждой мыши кровь получали в двух временных точках. Для каждой временной точки использовали по 2 мыши. Образцам крови давали свернуться в течение 30-60 минут при комнатной температуре и центрифугировали их при 3000 об/мин в течение 10 мин, после чего отбирали образцы сыворотки и хранили их при -80°C для дальнейшего анализа.

Образцы крови анализировали посредством ELISA для определения в них концентрации герцептина и гетеродимера против HER2/CD3. Кратко, на 96-луночный аналитический планшет NuncMaxisorp сорбировали рекомбинантный человеческий HER2 (Sino Biological, каталожный номер 10004-H08H) в количестве 100 мкл на лунку, 1 мкг/мл в карбонатном/бикарбонатном буфере (pH 9,6) в течение ночи при 4°C. Планшет промывали 5 раз с использованием PBST (Sigma, каталожный номер P-3563). В каждую лунку добавляли по 300 мкл 5%-го снятого молока в PBST для блокировки планшета и планшет инкубировали по меньшей мере 1 час при 25°C. Планшет промывали, как описано выше, затем в каждую лунку вносили образцы сыворотки, разведенные в 10%-й объединенной мышиной сыворотке, 1%-й BSA в PBST, по 100 мкл на лунку, и планшет инкубировали в течение 1 ч при 25°C. Планшет промывали, как описано выше, затем в каждую лунку вносили по 100 мкл антитела против человеческого IgG, конъюгированного с HRP (Chemicon, каталожный номер AP309P), разведение 1:2000 в 5%-м снятом молоке в PBST, и проводили инкубацию в течение 1 ч при 25°C. Планшет промывали, как описано выше, затем в каждую лунку вносили по 100 мкл TMB (BD OptEIA, каталожный номер 555214) и проводили окрашивание в течение 10 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали, добавляя в каждую лунку по 100 мкл 1 М H₂SO₄. Оптическую плотность при 450 нм определяли с использованием устройства для прочтения микропланшетов.

Как показано на **ФИГ. 12**, гетеродимер «антитело против HER2/scFv против CD3» продемонстрировал сходный с герцептином ФК-профиль после однократного внутривенного введения мышам (20 нмоль/кг). Фармакокинетические параметры гетеродимера «антитело против HER2/scFv против CD3» были следующими: период полувыведения $t_{1/2}$ составляет 129 часов; AUC_{last} составляет 30611 нМ*ч; T_{max} составляет 3 часа; C_{max} составляет 264 нМ; Vd составляет 85 мл/кг; CL составляет 0,45 мл/ч/кг; MRT_{last} составляет 88 часов. Резюме по способу получения гетеродимерной конструкции «антитело против HER2/scFv против CD3» представлено в **Таблице 5** ниже.

Таблица 5

Таблица 5	HER2/CD3	
Степень чистоты	99,7%	
Стабильность	Стабильна по меньшей мере 7 суток при 40°C	
Связывающая активность	HER2	MFI = 14,16 (герцептин: MFI = 20,55)
	CD3	MFI = 5,19 (бивалентное HER2/CD3: MFI = 8,17)

Пример 12 – Очистка гетеродимерного биспецифичного антитела «антитело против Trop-2/scFv против CD3»

Полученный культуральный супернатант очищали, как описано в Примере 5. Очищенный продукт анализировали посредством SDS-PAGE. Результат показан на **ФИГ. 13**. Степень чистоты гетеродимерного продукта «антитело против Trop-2/scFv против CD3» превышала 95%.

Пример 13 – Стабильность и связывающая активность гетеродимерного биспецифичного антитела «антитело против Trop-2/scFv против CD3» in vitro

Активность связывания Trop-2 гетеродимерными конструкциями «антитело против Trop-2/scFv против CD3» анализировали посредством ELISA. Кратко, на 96-луночный планшет для ELISA сорбировали рекомбинантный человеческий Trop-2 (Sino Biological, каталожный номер 10428-H08H) в количестве 100 мкл на лунку, 1 мкг/мл в карбонатном/бикарбонатном буфере (pH 9,6) в течение ночи при 4°C. Планшет промывали 5 раз с использованием PBST. В каждую лунку добавляли по 300 мкл 1%-го BSA в PBST для блокировки планшета и планшет инкубировали по меньшей мере 1 час при 25°C. Планшет промывали, как описано выше, затем в каждую лунку вносили образцы сыворотки, разведенные в 1%-м BSA в PBST, по 100 мкл на лунку, и планшет инкубировали в течение 1 ч при 25°C. Планшет промывали, как описано выше, затем в каждую лунку вносили по 100 мкл антитела против человеческого IgG, конъюгированного с HRP (Chemicon, каталожный номер AP309P), разведение 1:2000 в 1%-м BSA в PBST, и проводили инкубацию в течение 1 ч при 25°C. Планшет промывали, как описано выше, затем в каждую лунку вносили по 100 мкл TMB (BD OptEIA, каталожный номер 555214) и проводили окрашивание в течение 10 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали, добавляя в каждую лунку по 100 мкл 1 М H₂SO₄. Оптическую плотность при 450 нм определяли с использованием устройства для прочтения микропланшетов. Как показано на **ФИГ. 14**, гетеродимерная конструкция «антитело против Trop-2/scFv против CD3» обладает высокой аффинностью связывания с Trop-2. Активность связывания CD3 гетеродимерными конструкциями «антитело против Trop-2/scFv против CD3» анализировали посредством FACS с использованием клеток Jurkat с высокой экспрессией CD3. FACS проводили, как описано в Примере 8. Как показано в **Таблице 6**, гетеродимерная конструкция «антитело против Trop-2/scFv против CD3» связывалась с

клетками Jurkat с высокой аффинностью, что указывает на ее хорошую связывающую активность в отношении CD3.

Таблица 6. Связывающая активность в отношении клеток Jurkat с высокой экспрессией CD3

Образец	MFI
Изотипический контроль	3,34
mAb против Tgop-2	3,10
Гетеродимер «антитело против Tgop-2/scFv против CD3»	17,51

Пример 14 – Связывающая активность гетеродимерного биспецифичного антитела «антитело против Tgop-2/scFv против CD3» в отношении Tgop-2 и CD3 одновременно

Гетеродимер «антитело против Tgop-2/scFv против CD3» анализировали посредством FACS на предмет связывающей активности в отношении Tgop-2 и CD3 одновременно с использованием клеток VxPC-3 и клеток Jurkat. FACS проводили, как описано в Примере 9 выше. Клетки VxPC-3 окрашивали, следуя инструкции по применению набора PKH26, а клетки Jurkat окрашивали с использованием набора CFSE. Как показано на **ФИГ. 15**, посредством одновременного связывания с клетками VxPC-3 с высокой экспрессией Tgop-2 и клетками Jurkat с высокой экспрессией CD3 гетеродимер «антитело против Tgop-2/scFv против CD3» может индуцировать объединение клеток VxPC-3 и Jurkat, и это означает, что гетеродимер может привлекать Т-клетки к опухолевым клеткам и приводить к повышению активности по уничтожению раковых клеток.

Пример 15 – Цитотоксичность гетеродимерного биспецифичного антитела «антитело против Tgop-2/scFv против CD3» в отношении опухолевых клеток in vitro

Клетки-мишени (H1650 и VxPC-3) собирали и ресуспендировали в полной среде (RPMI 1640, содержащей 10% FBS) при плотности клеток 1×10^5 клеток/мл. Клетки-мишени H1650 и VxPC-3 высевали в 96-луночные планшеты, 50 мкл на лунку (5×10^3 клеток на лунку), соответственно, после чего вносили серийно разведенные образцы гетеродимера «антитело против Tgop-2/scFv против CD3» и контрольные образцы с полной средой в количестве 100 мкл на лунку. Клетки-эффекторы (человеческие PBMC, Lonza, каталожный номер CC-2702) ресуспендировали в полной среде при плотности клеток 2×10^6 или $0,5 \times 10^6$ клеток/мл и затем высевали по 50 мкл в каждую лунку (1×10^5 или $0,25 \times 10^5$ клеток на лунку). Культуральный планшет инкубировали в течение 3 суток в

CO₂-инкубаторе при 37°C. После инкубации отбирали супернатант и клетки промывали два раза с использованием 200 мкл DPBS для удаления эффекторных клеток. Добавляли 100 мкл полной среды и 20 мкл MTS и полученный образец инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 2-3 часов. Поглощение при 490 нм (значение OD) определяли с использованием устройства для прочтения микропланшетов. Цитотоксичность рассчитывали следующим образом:

$$\text{цитотоксичность} = \frac{\text{OD}_{\text{контроль}} - \text{OD}_{\text{эксперимент}}}{\text{OD}_{\text{контроль}}}$$

Как показано на **ФИГ. 16** (с эффекторными клетками), гетеродимер «антитело против Trop-2/scFv против CD3» уничтожал раковые клетки с высокой экспрессией Trop-2 (клетки немелкоклеточного рака легкого H1650 и клетки рака поджелудочной железы человека VxPC-3) зависимым от концентрации образом. Активность биспецифичного антитела по уничтожению клеток была намного выше, чем у mAb против Trop-2, демонстрируя высокую активность по уничтожению опухолевых клеток.

Пример 16 – Исследование фармакокинетики гетеродимерного биспецифичного антитела «антитело против Trop-2/scFv против CD3» у мышей

Фармакокинетику гетеродимера «антитело против Trop-2/scFv против CD3» исследовали у самок мышей BALB/c в возрасте 8 недель, приобретенных у Beijing HFК Bioscience Co., Ltd. Введение, сбор образцов крови и аналитический метод были такими же, как описано в Примере 11 выше. Образцы крови анализировали посредством ELISA с Trop-2 (Sino Biological, каталожный номер 10428-H08H) для определения в них концентрации гетеродимера «антитело против Trop-2/scFv против CD3». Как показано на **ФИГ. 17**, гетеродимер «антитело против Trop-2/scFv против CD3» продемонстрировал сходный с антителом против Trop-2 ФК-профиль после однократного внутрибрюшинного введения мышам (20 нмоль/кг). Фармакокинетические параметры гетеродимера «антитело против Trop-2/scFv против CD3» были следующими: период полувыведения $t_{1/2}$ составляет 165 часов; AUC_{last} составляет 26072 нМ*ч; T_{max} составляет 6 часов; C_{max} составляет 203 нМ; V_d составляет 107 мл/кг; CL составляет 0,45 мл/ч/кг; MRT_{last} составляет 92 часа.

Пример 17 – Очистка гетеродимерного биспецифичного антитела «антитело против CD20/scFv против CD3»

Полученный культуральный супернатант очищали, как описано в Примере 5 выше. Очищенный продукт анализировали посредством SDS-PAGE. Результат показан на **ФИГ. 18**. Степень чистоты гетеродимерного продукта «антитело против CD20/scFv против CD3» превышала 95%.

Пример 18 – Стабильность и связывающая активность гетеродимерного биспецифичного антитела «антитело против CD20/scFv против CD3» in vitro

Герметично закрытые образцы гетеродимера «антитело против CD20/scFv против CD3» (1 мг/мл и 10 мг/мл) хранили в инкубаторе при 40°C (BINDER, KBF240). Стабильность анализировали с использованием образцов объемом 20 мкл в разных временных точках (исходно (0 сутки), 1 сутки, 3 сутки, 6 сутки) с применением высокоэффективной эксклюзионной жидкостной хроматографии (SEC-HPLC). Как показано на **ФИГ. 19**, в условиях эксперимента при 40°C, существенной агрегации гетеродимера «антитело против CD20/scFv против CD3» не было. Полученные данные продемонстрировали, что гетеродимерная конструкция «антитело против CD20/scFv против CD3» обладала хорошей температурной стабильностью. Активность связывания CD20 и CD3 гетеродимером «антитело против CD20/scFv против CD3» анализировали посредством FACS с использованием клеток Raji (с высокой экспрессией CD20) и Jurkat (с высокой экспрессией CD3). FACS проводили, как описано в Примере 8 выше. Как показано в **Таблице 7** и **Таблице 8**, гетеродимерная конструкция «антитело против CD20/scFv против CD3» связывалась с клетками Raji и клетками Jurkat, что указывает на связывание этой конструкции как с антигеном CD20, так и с антигеном CD3.

Таблица 7. Связывающая активность в отношении клеток Raji с высокой экспрессией CD20

Образец	MFI
Изотипический контроль	2,77
Гетеродимер «антитело против CD20/scFv против CD3»	7,28

Таблица 8. Связывающая активность в отношении клеток Jurkat с высокой экспрессией CD3

Образец	MFI
Изотипический контроль	2,75
Гетеродимер «антитело против CD20/scFv против CD3»	5,61

Пример 19 – Очистка гетеродимерного биспецифичного антитела «антитело против PD-L1/scFv против CD3»

Полученный культуральный супернатант очищали, как описано в Примере 5 выше. Очищенный продукт анализировали посредством SDS-PAGE. Результат показан на **ФИГ. 20**. Степень чистоты гетеродимерного продукта «антитело против PD-L1/scFv против CD3» превышала 95%.

Пример 20 – Связывающая активность гетеродимерного биспецифичного антитела «антитело против PD-L1/scFv против CD3» in vitro

Активность связывания PD-L1 гетеродимерной конструкцией «антитело против PD-L1/scFv против CD3» анализировали посредством ELISA. ELISA проводили, как описано в Примере 13 выше. На планшет для ELISA сорбировали PD-L1 (Sino Biological, каталожный номер 10084-H08H). Как показано на **ФИГ. 21**, гетеродимер «антитело против PD-L1/scFv против CD3» обладает высокой аффинностью связывания с PD-L1.

Активность связывания CD3 гетеродимером «антитело против PD-L1/scFv против CD3» анализировали посредством FACS с использованием клеток Jurkat (с высокой экспрессией CD3). FACS проводили, как описано в Примере 8 выше. Как показано в **Таблице 9**, гетеродимер «антитело против PD-L1/scFv против CD3» связывался с клетками Jurkat, что указывает на его связывание с антигеном CD3.

Таблица 9. Связывающая активность в отношении клеток Jurkat с высокой экспрессией CD3

Образец	MFI
Изотипический контроль	2,70
Гетеродимер «антитело против PD-L1/scFv против CD3»	8,90

Пример 21 – Связывающая активность гетеродимерного биспецифичного антитела «антитело против PD-L1/scFv против CD3» в отношении PD-L1 и CD3 одновременно

Гетеродимер «антитело против PD-L1/scFv против CD3» анализировали посредством FACS на предмет связывающей активности в отношении PD-L1 и CD3 одновременно с использованием клеток H460 и клеток Jurkat. Анализ проводили, как описано в Примере 9 выше. Как показано на **ФИГ. 22**, гетеродимерная конструкция «антитело против PD-L1/scFv против CD3» может индуцировать объединение клеток H460 (с высокой экспрессией PD-L1) с клетками Jurkat (с высокой экспрессией CD3), и

это означает, что гетеродимер может привлекать Т-клетки к опухолевым клеткам и приводить к повышению активности по уничтожению раковых клеток.

Пример 22 – Цитотоксичность гетеродимерного биспецифичного антитела «антитело против PD-L1/scFv против CD3» in vitro

Клетки-мишени (H1650 и HCC827) собирали и ресуспендировали в полной среде RPMI 1640 (10% FBS) при плотности клеток 1×10^5 клеток/мл. Клетки-мишени H1650 и HCC827 высевали в 96-луночные планшеты в количестве 50 мкл на лунку (5×10^3 клеток на лунку), после чего вносили серийно разведенные образцы гетеродимера «антитело против PD-L1/scFv против CD3» и контрольные образцы с полной средой в количестве 100 мкл на лунку. Клетки-эффекторы (человеческие РВМС, Lonza, каталожный номер СС-2702) ресуспендировали в полной среде при плотности клеток 2×10^6 клеток/мл и затем высевали по 50 мкл в каждую лунку (1×10^5 клеток на лунку). Культуральный планшет инкубировали в течение 3 суток в CO₂-инкубаторе при 37°C. После инкубации отбирали супернатант и клетки промывали два раза с использованием 200 мкл DPBS для удаления эффекторных клеток. В образец добавляли 100 мкл полной среды и 20 мкл MTS, после чего инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 2-3 часов. Поглощение при 490 нм (значение OD) определяли с использованием устройства для прочтения микропланшетов. Цитотоксичность рассчитывали следующим образом:

$$\text{цитотоксичность} = \frac{\text{OD}_{\text{контроль}} - \text{OD}_{\text{эксперимент}}}{\text{OD}_{\text{контроль}}}$$

Как показано на **ФИГ. 23** (с эффекторными клетками), гетеродимерная конструкция «антитело против PD-L1/scFv против CD3» уничтожала раковые клетки с высокой экспрессией PD-L1 (клетки немелкоклеточного рака легкого H1650 и HCC827) зависимым от концентрации образом, демонстрируя высокую активность по уничтожению опухолевых клеток.

Пример 23 – Очистка продуктов экспрессии антител против HER2 и против CD20 для получения биспецифичного антитела в формате Fab-Fab

Для очистки использовали систему АКТА Explorer 100 (GE Healthcare) с колонкой для аффинной хроматографии Protein A Sepharose Fast Flow (внутренний диаметр 16 мм, 22 мл, GE Healthcare) при 4°C. Исходно колонку уравнивали с использованием буфера А (20 мМ PBST; 150 мМ NaCl, pH 7,4), при этом клеточный супернатант вносили после стабилизации нулевой линии со скоростью потока 5 мл/мин и затем проводили уравнивание с использованием буфера А. Образцы представляли собой продукты экспрессии антител против HER2 и против CD20 с аминокислотными мутациями в

доменах СНЗ, экспрессированные методами, описанными в Примере 4 выше. После этого проводили промывку колонки 5 объемами колонки буфера В1 (буфер А + 0,5 М Arg) и затем элюирование 5 объемами колонки буфера В2 (100 мМ лимонная кислота, рН 3,0) с получением пика элюирования, представляющего собой желаемый белок. Скорость потока на стадии элюирования составляла 5 мл/мин. Типичная хроматограмма продукта антитела против CD20 показана на **ФИГ. 24**; для продукта антитела против HER2 были получены сходные результаты (не показано). Пик элюирования, показанный серым цветом, собирали и добавляли 1 М ацетат натрия для корректировки рН до 5,0.

Пример 24 – Очистка гетеродимерного биспецифического антитела «антитело против HER2/антитело против CD20» наподобие естественного IgG

Общая структура гетеродимера «антитело против HER2/антитело против CD20» показана на **ФИГ. 25**.

Проводили повторное объединение очищенных продуктов по Примеру 23 *ex vivo* с образованием гетеродимеров. Сначала проводили замену буфера на забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS) с применением концентрирования ультрафильтрацией (отсечение по молекулярной массе 10 кДа). Концентрацию каждого из продуктов антител против HER2 и против CD20 корректировали до 1 мг/мл в PBS и добавляли 1/200 объема 1 М дитиотреитола (DTT) (конечная концентрация DTT составляла 0,1 мМ, 0,5 мМ, 1 мМ, 2 мМ, 5 мМ, 10 мМ или 20 мМ). Затем проводили восстановление при 4°C в течение 3-8 часов. Во время этой стадии восстановления дисульфидные связи, такие как дисульфидные связи в шарнирной области гомодимеров, которые могут присутствовать в продуктах экспрессии антител против HER2 и против CD20, разрываются, что приводит к образованию полуантител (или полумеров) с одной легкой цепью и одной тяжелой цепью, как показано на **ФИГ. 26**. После стадии восстановления образец анализировали посредством SDS-PAGE в денатурирующих условиях. Типичные результаты для продукта антитела против CD20 показаны на **ФИГ. 27**; для продукта антитела против HER2 были получены сходные результаты (не показано). На **ФИГ. 27** четыре основные полосы, присутствующие на дорожках 2-4, представляют собой, сверху вниз: гомодимер LC-НС-НС-LC, полумер НС-LC, НС и LC, соответственно. Как показано на **ФИГ. 27**, при увеличении концентрации DTT остаются видны только две полосы (НС и LC) практически без гомодимеров. На **ФИГ. 28** показаны результаты SEC-HPLC-анализа в присутствии 1 мМ DTT в PBS, полученные для полуантитела против HER2 (А) и полуантитела против CD20 (В). Как показано на **ФИГ. 28**, при концентрации DTT, равной или превышающей 1 мМ, доля гомодимеров

каждого из продуктов антител против HER2 и против CD20 составляла менее 10%, а доля молекул полуантител (полумеров) – более 90% по массе всех рассматриваемых полипептидных форм.

Восстановленные полумеры против HER2 и против CD20 затем смешивали 1:1 (молярное отношение), и проводили их повторное объединение при 4°C в течение 0,5-24 часов. При таком повторном объединении полумеры против HER2 и против CD20 образовывали гетеродимер «антитело против HER2/антитело против CD20», содержащий оба полумера, удерживаемые друг рядом с другом преимущественно нековалентными взаимодействиями CH₂/CH₃. Затем проводили замену буфера на PBS с применением концентрирования ультрафильтрацией (отсечение по молекулярной массе 10 кДа). Состояние восстановления прекращали посредством окисления воздухом или окислителем с образованием в гетеродимерном биспецифичном антителе межцепочечных дисульфидных связей. Условия окисления включали воздействие воздуха в течение 1 суток, 3 суток, 4 суток или добавление окислителя 100 мМ L-дегидроаскорбиновой кислоты (конечная концентрация белка составляла 1 мг/мл, а конечная концентрация окислителя – 0,5 мМ, 1 мМ, 5 мМ или 10 мМ) при 4°C и инкубацию в течение 5 или 24 часов. После окисления продукт анализировали посредством SDS-PAGE. Результат показан на **ФИГ. 29**.

С применением концентрации ультрафильтрацией (отсечение по молекулярной массе 10 кДа) указанный выше гетеродимер «антитело против HER2/антитело против CD20», полученный восстановлением-окислением полумеров против HER2 и против CD20, концентрировали и проводили замену буфера на 10 мМ PBST, pH 5,8. Для очистки образцов использовали систему АКТА Explorer 100 (GE Healthcare) с колонкой для ионообменной хроматографии Source 15S (внутренний диаметр 16 мм, 17 мл, GE Healthcare) при 4°C. Исходно колонку уравнивали с использованием буфера А (10 мМ Na₃PO₄, pH 7,0), при этом раствор белка, обработанный как указано выше, вносили после стабилизации нулевой линии со скоростью потока 3 мл/мин и затем проводили уравнивание с использованием буфера А. После этого, используя градиент от буфера А (10 мМ Na₃PO₄, pH 7,0) до буфера В (10 мМ Na₃PO₄, pH 5,8), колонку промывали 20 объемами колонки (0% В – 100% В за 170 минут, скорость потока 2 мл/мин). Собирали основной отмеченный пик элюирования (показанный на **ФИГ. 30**). Собранный раствор белка концентрировали, еще раз заменяя буфер на PBS (pH 7,4) и используя ультрафильтрационную пробирку (отсечение по молекулярной массе 10 кДа), и стерилизовали фильтрацией при 4°C для хранения. Очищенный продукт анализировали

посредством SDS-PAGE. Результат показан на **ФИГ. 31**. Продукт также анализировали посредством SEC-HPLC, результат показан на **ФИГ. 32**. Степень чистоты составила 97,3%.

Пример 25 – Разработка метода анализа для определения гетеродимера «антитело против HER2/антитело против CD20»

Проводили HPLC-анализ следующих пяти образцов: полуантитело против HER2, гомодимер против HER2, полуантитело против CD20, гомодимер против CD20 и гетеродимер «антитело против HER2/антитело против CD20». Эксперимент проводился следующим образом: (1) колонка для хроматографии гидрофобного взаимодействия (TSK-GEL Phenyl-5PW, 7,5 мм (внутренний диаметр) x 7,5 см, 10 мкм); (2) подвижная фаза и градиент: буфер А: 20 мМ PBS, рН 7,0, 1 М (NH₄)₂SO₄; буфер В: 20 мМ PBS, рН 7,0; градиент от 40% буфера В до 100% буфера В за 40 минут; (3) скорость потока: 0,5 мл/мин; (4) температура: 25°C; (5) длина волны при детекции: 280 нм. Как хорошо видно по результатам, показанным на **ФИГ. 33**, данный метод позволяет эффективно различать гомодимер Fc1 против CD20 (пик 1 на **ФИГ. 33**), гомодимер Fc2 против HER2 (пик 5 на **ФИГ. 33**) и гетеродимер «антитело против HER2/антитело против CD20» (пик 3 на **ФИГ. 33**) по разному времени их удерживания. Эти результаты подтвердили, что продукт, полученный в Примере 24, является гетеродимером, а не гомодимером.

Пример 26 – Определение гетеродимера «антитело против HER2/антитело против CD20» по масс-спектрам

Три следующих образца, гомодимер против HER2, гомодимер против CD20 и гетеродимер «антитело против HER2/антитело против CD20» анализировали методом LC-MS, рассчитывая долю определяемых аминокислот. Указанные выше образцы обрабатывали трипсином и инкубировали при 37°C в течение 18 часов. Условия LC-MS были следующими. Колонка: Waters ACQUITY UPLC BEH C18, 300Å, 1,7 мкм, 2,1 мм x 100 мм. Температура колонки: 50°C. Скорость потока: 0,2 мл/мин. Буфер А: 0,1%-я муравьиная кислота. Буфер В: 0,1%-я муравьиная кислота/100%-й ацетонитрил. Градиент элюирования: 2-35% буфера В за 90 мин; 35-45% буфера В за 20 мин. Источник ESI: режим положительных ионов. Напряжение на капилляре: 2,5 кВ. Напряжение на конусе: 25 В. Диапазон сканирования: 100-2500 Да. Напряжение MS^c: 20-40 В.

На **ФИГ. 34** показана ионообменная хроматограмма основного пика (base peak ion chromatogram, BPI) гомодимера против HER2, гомодимера против CD20 и гетеродимера «антитело против HER2/антитело против CD20» (**Фиг. 34А**), а также доля определяемых аминокислот для каждого образца (**Фиг. 34В**). Для гомодимера против CD20 указанная

доля составляла 99,7%, для гомодимера против HER2 – 100%, для гетеродимера «антитело против HER2/антитело против CD20» – 99,4%. Аминокислотные последовательности легкой цепи и тяжелой цепи гомодимера против CD20, содержащие две характерные аминокислотные замены, определенные при LC-MS, показаны в SEQ ID NO:73 и 74, соответственно. Аминокислотные последовательности легкой цепи и тяжелой цепи гомодимера против HER2, содержащие три характерные аминокислотные замены, определенные при LC-MS, показаны в SEQ ID NO:75 и 76, соответственно. Аминокислотные последовательности легкой цепи и тяжелой цепи против CD20 гетеродимера против CD20/HER2, содержащие две характерные аминокислотные замены, определенные при LC-MS, показаны в SEQ ID NO:77 и 78, соответственно. Аминокислотные последовательности легкой цепи и тяжелой цепи против HER2 гетеродимера против CD20/HER2, содержащие три характерные аминокислотные замены, определенные при LC-MS, показаны в SEQ ID NO:79 и 80, соответственно. Аминокислоты глицин в положении 66 и лизин в положении 67 в SEQ ID NO:74, аминокислоты глицин в положении 66, лизин в положении 67, лизин в положении 218, аланин в положении 343, лизин в положении 344 в SEQ ID NO:78 и аминокислоты лизин в положении 217, аланин в положении 342, лизин в положении 343 в SEQ ID NO:80 при LC-MS-анализе обнаружены не были. Полученные результаты показали, что гетеродимер «антитело против HER2/антитело против CD20» имел ожидаемую последовательность.

Специалистам в данной области будет ясна возможность проведения множества различных модификаций и изменений без выхода за рамки объема и сущности настоящего изобретения. Таким образом, следует понимать, что различные воплощения изобретения, описанные здесь, приведены лишь для наглядности и не ограничивают объем изобретения. Все ссылки, приведенные здесь, полностью включены сюда посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> Beijing Hanmi Pharm. Co., Ltd.
 Liu , Jiawang
 Song, Nanmeng
 Yang , Dongge
 Yang , Yaping
 Kim, Maeng Sup
- <120> ГЕТЕРОДИМЕРНЫЕ ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫЕ КОНСТРУКЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ
- <130> LZ1706112CN07
- <150> CN 2016108638147
 <151> 2016-09-29
- <160> 80
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial
- <220>
 <223> Синтетическая
- <400> 1
 tggggccsag ccggccagat ct 22
- <210> 2
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
- <220>
 <223> Синтетическая
- <400> 2
 ataagaatgc ggccgcgctcg acctgca 27
- <210> 3
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial
- <220>
 <223> Синтетическая
- <400> 3
 atcgagtcaa tattaggggtt agtaaaaggg tcctaaggaa c 41
- <210> 4
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial
- <220>
 <223> Синтетическая

<400> 4
cagtcgataa tattaagaat taattctcat gtttgacagc ttat 44

<210> 5
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Синтетическая

<400> 5
tagcctcccc ctagggtggg cgaagaactc cagcatg 37

<210> 6
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Синтетическая

<400> 6
tttggaggcc taggcttttg caaagatcga tcaagagaca ggatgagga 49

<210> 7
<211> 2773
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Синтетическая

<400> 7
tgctggggcc cagccggcca tgagcgacag cgaggtgaac caggaggcca aacccgaggt 60
gaagcccgag gtgaaacccg agaccsacat caacctgaag gtgagcgacg gcagcagcga 120
gatcttcttc aagatcaaga agaccacccc cctgaggagg ctgatggagg ccttcgcca 180
gaggcagggc aaggagatgg acagcctgag gttcctgtac gacggcatcc gtattcaage 240
cgaccagacc cctgaggacc tggacatgga ggacaacgac atcatcgagg cccacagggg 300
gcagatcggc ggcgaaccca agtccagcga taagaccac acatgccctc cctgtcctgc 360
tcccgaactg ctgggaggac cctccgtctt cctgttcccc cccaagcca aagacacact 420
gatgatcagc aggaccctg aagtgacctg cgtggtcgtg gacgtgagcc acgaggacct 480
cgaggtcaag tttaactggt acgtggacgg cgtggaggtc cacaacgcca agaccaagcc 540
cagggaggag cagtacaaca gcacctacag ggtcgtgtcc gtgctgaccg tgctccacca 600
agattggctc aacggcaagg agtataagtg caaagtcagc aacaaggccc tccccgccc 660
catcgagaaa accatcagca aggccaaggg ccaaccgagg gaacctcaag tgtataacct 720
ccctcccagc cgggatgagc tgaccaagaa ccaagtctcc ctcacctgcc tgggtcaaggg 780

attctaccct	tccgacattg	cgcgcgaatg	ggagagcaat	ggccagcccg	agaacaacta	840
caagacaacc	ccccccgtcc	tggatagcga	cggatccttc	ttcctgtact	ccaagctcac	900
cgtcgacaag	agccggtggc	aacagggcaa	cgtgttctcc	tgtagcgtga	tgcacgaagc	960
cctccacaac	cactataccc	agaagagcct	gagcctcagc	cccggcaaat	gatgaagatc	1020
tctagagctc	gctgatcagc	ctcgactgtg	ccttctagtt	gccagccatc	tgttgtttgc	1080
ccctcccccg	tgccttcctt	gaccctggaa	ggtgccactc	ccactgtcct	ttcctaataa	1140
aatgaggaaa	ttgcatcgca	ttgtctgagt	aggtgtcatt	ctattctggg	gggtgggggtg	1200
gggcaggaca	gcaaggggga	ggattgggaa	gacaatagca	ggcatgctgg	ggatgcgggtg	1260
ggctctatgg	cttctgaggc	ggaaagaacc	agctggggct	ctagggggta	tccccacgcg	1320
ccctgtagcg	gcgcagcgcg	cgttgacatt	gattattgac	tagttattaa	tagtaatcaa	1380
ttacggggtc	attagttcat	agcccatata	tggagtccg	cgttacataa	cttacggtaa	1440
atggcccgcc	tggctgaccg	ccaacgacc	cccgccatt	gacgtcaata	atgacgtatg	1500
ttcccatagt	aacgccaata	gggactttcc	attgacgtca	atgggtggac	tatttacggt	1560
aaactgccc	cttggcagta	catcaagtgt	atcatatgcc	aagtacgccc	cctattgacg	1620
tcaatgacgg	taaatggccc	gcctggcatt	atgccagta	catgacctta	tgggactttc	1680
ctacttggca	gtacatctac	gtattagtca	tcgctattac	catgggtgatg	cggttttggc	1740
agtacatcaa	tgggcgtgga	tagcggtttg	actcacgggg	atttccaagt	ctccacccca	1800
ttgacgtcaa	tgggagtttg	ttttggcacc	aaaatcaacg	ggactttcca	aaatgtcgta	1860
acaactccgc	cccattgacg	caaatgggcg	gtaggcgtgt	acgggtgggag	gtctatataa	1920
gcagagctct	ctggctaact	agagaacca	ctgcttactg	gcttatcgaa	atgccaccat	1980
ggagacagac	acactcctgc	tatgggtact	gctgctctgg	gttccagggt	ccactggtga	2040
ctatccatat	gatgttcag	attatgctga	gcccaagtcc	agcgacaaga	cccacacatg	2100
cccccttgt	cctgcccctg	aactgctcgg	aggccctage	gtgttcctct	tccctcccaa	2160
accaaggac	accctcatga	tctccaggac	ccctgaggtg	acctgcgtcg	tgggtggacgt	2220
cagccacgag	gaccccgagg	tgaagttaa	ctggtacgtg	gacggcgtcg	aggtccacaa	2280
cgccaagaca	aagcccaggg	aggaacagta	caacagcacc	tacaggggtg	tcagcgtgct	2340
gaccgtgctg	caccaggatt	ggctcaacgg	caaggagtac	aagtgcaaag	tctccaacaa	2400
ggcctgccc	gccccatcg	agaagaccat	ctccaaggct	aagggacagc	ccagggagcc	2460
ccaagtgtac	accctcctc	ccagccggga	tgagctgacc	aagaaccaag	tctccctcac	2520
ctgcctggtc	aagggttct	acccttccga	cattgccgtc	gaatgggaga	gcaatggcca	2580
gcccgagaac	aactacaaga	caaccccccc	cgtcctggat	agcgacggat	ccttcttctc	2640
gtactccaag	ctcacgctcg	acaagagcag	atggcagcag	ggcaacgtgt	tcagctgtag	2700

cgtgatgcac gaggcctgc acaaccacta cacccagaag agcctgtccc tcagccccgg 2760
 caagctgcag aat 2773

<210> 8
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Синтетическая

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (41)..(42)
 <223> n может представлять собой а, с, г или т

<400> 8
 tcccagccgg gatgagctga cсаагаасса agtctccctc nnstgcctgg tсааgggatt 60
 ctacccttc 69

<210> 9
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Синтетическая

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (44)..(45)
 <223> n может представлять собой а, с, г или т

<400> 9
 gtccacggtg agcttgagt асаггаагаа ggatccgtcg ctsnncagga cgggggggggt 60
 tgtctt 66

<210> 10
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 10
 tactccaagc tcaccgtgga саагагс 27

<210> 11
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 11
cgatccaatc gatggaagat cttcatcatt tgccggggct gaggctcagg ct 52

<210> 12
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Синтетическая

<400> 12
saagggssag ccgsgggaac ctcaagtgta taccctccct cccagccggg atgagctgac 60

саагаассаа 70

<210> 13
<211> 52
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Синтетическая

<400> 13
cgatccaatc gatggaagat cttcatcatt tgccggggct gaggctcagg ct 52

<210> 14
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Синтетическая

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(32)
<223> n может представлять собой а, с, г или т

<400> 14
ggccagccca gggaacctca agtgtacacc nnsctccca gccgggatga gctg 54

<210> 15
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Синтетическая

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(36)
<223> n может представлять собой а, с, г или т

<220>

<221> misc_feature
<222> (41)..(42)
<223> n может представлять собой a, c, g или t

<400> 15
gcctgttgc caccggctct tgctgacggt gagsnnggas nncaggaaga aggatccgtc 60
gct 63

<210> 16
<211> 232
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность Fc1

<400> 16

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Leu Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Cys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 17
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Последовательность Fc2

<400> 17

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Gly Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Leu
180 185 190

Ser Cys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 18
<211> 232
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность Fc1

<400> 18

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Leu Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Cys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 19
<211> 232
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность Fc2

<400> 19

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Tyr Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Ala
180 185 190

Ser Pro Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 20
<211> 232
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность Fc1

<400> 20

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Val Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Thr Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 21
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Последовательность Fc2

<400> 21

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Lys Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Thr
180 185 190

Ser Gln Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 22
<211> 232
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность Fc1

<400> 22

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Leu Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Ala Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 23
<211> 232
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность Fc2

<400> 23

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Trp Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu His
180 185 190

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 24
<211> 232
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Последовательность Fc1

<400> 24

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Pro Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asn Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 25
<211> 232
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Последовательность Fc2

<400> 25

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Val Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Pro
180 185 190

Ser Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 26
<211> 232
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность Fc1

<400> 26

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Pro Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Ile Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 27
<211> 232
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность Fc2

<400> 27

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Pro Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Phe
180 185 190

Ser Phe Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 28
<211> 232
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность Fc1

<400> 28

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Gly Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 29
<211> 232
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность Fc2

<400> 29

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Asp Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Pro
180 185 190

Ser Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 30
<211> 232
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность Fc1

<400> 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Leu Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Arg Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 31
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Последовательность Fc2

<400> 31

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Glu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Leu
180 185 190

Ser Val Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 32
<211> 312
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность VL

<400> 32
gacattcaga tgactcagag cccttcttca ctgtcagctt ccgtggggcga cagagtcact 60
atcacctgcc gcgcaagtca ggatgtgaac accgcagtcg cctggtacca gcagaagcct 120
ggcaaagctc caaagctgct gatctacagc gcattctttcc tgtattctgg agtgcccagt 180
aggtttagtg ggtcacggtc cggtagccgac ttcacactga ctatctccag cctgcagcct 240
gaggattttg ccacatacta ttgccagcag cactatacca cccccctac tttcgggccag 300
ggaaccaaag tg 312

<210> 33
<211> 104
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность VL

<400> 33

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
100

<210> 34
<211> 330
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность CL

<400> 34

gagatcaagc gaactgtggc cgctccaagc gtcttcattt ttccaccctc tgacgaacag 60

ctgaagtcag ggacagcttc cgtgggtctgt ctgctgaaca atttttaccc cagggaggcc 120

aaagtgcagt ggaaggtcga taacgctctg cagagcggaa attctcagga gagtgtgaca 180

gaacaggact caaaagattc cacttatagc ctgtctagta ccctgacact gtccaaggca 240

gactacgaaa agcataaagt gtatgcctgt gaggtcacac atcaggggtct gtcaagcccc 300

gtcactaagt cttcaatcg tggcgaatgc 330

<210> 35
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Последовательность CL

<400> 35

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
1 5 10 15

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
20 25 30

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
35 40 45

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
50 55 60

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
65 70 75 80

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
85 90 95

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105 110

<210> 36

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Последовательность VH

<400> 36

gaggtgcagc tggtcgaaag tgggggtggg ctggtgcagc caggcggatc actgaggctg 60

tcttgcgccg ctagcggctt caacatcaaa gacacctata ttcactgggt ccgacaggca 120

ccaggaagg gtctggaatg ggtggctcgt atctacccta caaatggtta cactagatat 180

gccgactccg tgaaggccg gtttactatt tctgctgata ccagtaagaa cacagcatac 240

ctgcagatga atagcctgag ggctgaggat accgcagtgt actattgctc tcgggtggggg 300

ggtgacggct tctacgctat ggattattgg ggccagggaa ctctgggtcac cgtgtccagc 360

<210> 37

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Последовательность VH

<400> 37

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 38

<211> 990

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Последовательность CH

<400> 38

gcttcaacaa aaggaccttc cgtgtttcca ctggcaccct ctagtaagag tacttcagga 60
ggaaccgcag cactgggatg tctggtgaag gactacttcc cagagcccgt caccgtgtct 120
tggaacagtg gagcactgac ctccggggtc catacatttc ctgccgtgct gcagtcatcc 180
ggtctgtata gcctgagctc tgtggtcaca gtcccaagtt catccctggg caccagaca 240
tacatctgca acgtgaatca caaaccttcc aatactaagg tgcacaagaa agtggaaacca 300
aaaagctgtg ataagactca tacctgcca ccttgctctg caccagagct gctgggaggt 360
ccaagcgtgt tcctgtttcc acccaagccc aaagacacac tgatgatttc tcgcacacc 420
gaagtcactt gtgtggcgt ggacgtgtcc cagcaggatc ctgaagtcaa gttcaactgg 480
tacgtggatg gcgtcgaggt gcataatgct aagaccaaac ccagagagga acagtacaac 540
agcacctatc gcgtcgtgtc tgtcctgaca gtgctgcacc aggattggct gaacggaaag 600
gagtacaagt gcaagtggag caacaaggcc ctgcccgtc ctatcgagaa gaccatttct 660

aaggctaaag gccagcctag agaaccacag gtgtatacac tgcctccaag tcgcgacgag 720
ctgacaaaaa accaggtctc cctgctgtgt ctggtgaagg gattctaccc tagcgatatc 780
gcagtggagt ggaatctaa tgggcagcca gaaaacaatt ataagaccac accccctgtg 840
ctgtgctcag atggttcctt ctttctgtac agtaaactga ccgtggacaa gtccaggtgg 900
cagcagggga acgtcttttc ctgcagcgtg atgcatgagg ccctgcacaa tcattacaca 960
cagaaatctc tgagtctgtc accaggaaag 990

<210> 39
<211> 330
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность CH

<400> 39

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Leu Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Cys Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 40

<211> 990

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Последовательность CH

<400> 40

gcttcaacaa aaggaccttc cgtgtttcca ctggcaccct ctagtaagag tacttcagga 60

ggaaccgcag cactgggatg tctggtgaag gactacttcc cagagcccgt caccgtgtct 120

tggaacagtg gagcactgac ctccggggtc catacatttc ctgccgtgct gcagtcatcc 180

ggtctgtata gctgagctc tgtggtcaca gtcccaagtt catccctggg caccagaca 240

tacatctgca acgtgaatca caaaccttcc aatactaagg tcgacaagaa agtggaaacca 300

aaaagctgtg ataagactca tacctgcca cttgtcctg caccagagct gctgggaggt 360

ccaagcgtgt tcctgtttcc acccaagccc aaagacacac tgatgatttc tcgcacaccc 420
 gaagtcactt gtgtggtcgt ggacgtgtcc cagcaggatc ctgaagtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggatg gcgtcgaggt gcataatgct aagaccaaac ccagagagga acagtacaac 540
 agcacctatc gcgtcgtgtc tgtcctgaca gtgctgcacc aggattggct gaacggaaag 600
 gagtacaagt gcaaagtgag caacaaggcc ctgcccgtc ctatcgagaa gaccatttct 660
 aaggctaaag gccagcctag agaaccacag gtgtatacag agcctccaag tcgcgacgag 720
 ctgacaaaaa accaggtctc cctgacttgt ctgggtgaagg gattctaccc tagcgatata 780
 gcagtggagt gggaaatctaa tgggcagcca gaaaacaatt ataagaccac accccctgtg 840
 ctggactcag atggttcctt ctttctgctg agtgtgctga ccgtggacaa gtccaggtgg 900
 cagcagggga acgtcttttc ctgcagcgtg atgcatgagg cctgcacaa tcattacaca 960
 cagaaatctc tgagtctgtc accaggaaag 990

<210> 41
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Последовательность CH

<400> 41

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Glu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Leu Ser Val Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 42
<211> 309
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность VL

<400> 42
cagatcgtgc tgagccagag ccccgccatc ctgagcgcca gccccggcga gaaggtgacc

atgacctgca gggccagcag cagcgtgagc tacatccact ggttccagca gaagcccggc 120
 agcagcccca agccctggat ctacgccacc agcaacctgg ccagcggcgt gcccgtaggg 180
 ttcagcggca gcggcagcgg caccagctac agcctgacca tcagcagggt ggaggccgag 240
 gagccgcca cctactactg ccagcagtgg accagcaacc cccccacctt cggcggcggc 300
 accaagctg 309

<210> 43
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Последовательность VL

<400> 43

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100

<210> 44
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Последовательность VH

<400> 44

caggtgcagc tgcagcagcc cggcgccgag ctggtgaagc ccggcgccag cgtgaagatg 60
 agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agctacaaca tgcaactgggt gaagcagacc 120
 cccggcaggg gcctggagtg gatcggcgcc atctaccccg gcaacggcga caccagctac 180

aaccagaagt tcaagggcaa ggccaccctg accgccgaca agagcagcag caccgcctac 240
atgcagctga gcagcctgac cagcgaggac agcgccgtgt actactgcgc caggagcacc 300
tactacggcg gcgactggta cttcaacgtg tggggcgccg gcaccaccgt gaccgtgagc 360
gcc 363

<210> 45
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность VH

<400> 45

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

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

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 46
<211> 990
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность CH

<400> 46

gcttcaacaa aaggaccttc cgtgtttcca ctggcaccct ctagtaagag tacttcagga 60

ggaaccgcag cactgggatg tctgggtgaag gactacttcc cagagcccgt caccgtgtct 120

tggaacagtg gagcactgac ctccggggtc catacatttc ctgccgtgct gcagtcatecc	180
ggctctgtata gcctgagctc tgtgggtcaca gtcccaagtt catccctggg caccagaca	240
tacatctgca acgtgaatca caaaccttcc aatactaagg tcgacaagaa agtggaaacca	300
aaaagctgtg ataagactca tacctgcccc ccttgtcctg caccagagct gctgggaggt	360
ccaagcgtgt tctgtttcc acccaagccc aaagacacac tgatgatttc tcgcacaccc	420
gaagtcactt gtgtggctgt ggacgtgtcc cagcaggatc ctgaagtcaa gttcaactgg	480
tacgtggatg gcgtcgaggt gcataatgct aagaccaaac ccagagagga acagtacaac	540
agcacctatc gcgtcgtgtc tgtcctgaca gtgctgcacc aggattggct gaacggaaag	600
gagtacaagt gcaaagtgag caacaaggcc ctgcccgtc ctatcgagaa gaccatttct	660
aaggctaaag gccagcctag agaaccacag gtgtatacac tgctccaag tcgcgacgag	720
ctgacaaaaa accaggtctc cctgctgtgt ctgggtgaagg gattctacc tagcgatatac	780
gcagtggagt gggaaatctaa tgggcagcca gaaaacaatt ataagaccac acccctgtg	840
ctgtgctcag atggttcctt ctttctgtac agtaaactga ccgtggacaa gtccaggtgg	900
cagcagggga acgtcttttc ctgcagcgtg atgcatgagg ccctgcacaa tcattacaca	960
cagaaatctc tgagtctgtc accaggaaag	990

<210> 47
 <211> 990
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Последовательность СН

<400> 47	
gcttcaaaa aaggacctc cgtgtttcca ctggcaccct ctagtaagag tacttcagga	60
ggaaccgag cactgggatg tctgggtgaag gactacttcc cagagcccgt caccgtgtct	120
tggaacagtg gagcactgac ctccggggtc catacatttc ctgccgtgct gcagtcatecc	180
ggctctgtata gcctgagctc tgtgggtcaca gtcccaagtt catccctggg caccagaca	240
tacatctgca acgtgaatca caaaccttcc aatactaagg tcgacaagaa agtggaaacca	300
aaaagctgtg ataagactca tacctgcccc ccttgtcctg caccagagct gctgggaggt	360
ccaagcgtgt tctgtttcc acccaagccc aaagacacac tgatgatttc tcgcacaccc	420
gaagtcactt gtgtggctgt ggacgtgtcc cagcaggatc ctgaagtcaa gttcaactgg	480
tacgtggatg gcgtcgaggt gcataatgct aagaccaaac ccagagagga acagtacaac	540
agcacctatc gcgtcgtgtc tgtcctgaca gtgctgcacc aggattggct gaacggaaag	600
gagtacaagt gcaaagtgag caacaaggcc ctgcccgtc ctatcgagaa gaccatttct	660
aaggctaaag gccagcctag agaaccacag gtgtatacac tgctccaag tcgcgacgag	720

ctgacaaaa accaggtctc cctgctgtgt ctggtgaagg gattctaccc tagcgatac 780
gcagtggagt gggaatctaa tgggcagcca gaaaacaatt ataagaccac accccctgtg 840
ctgcggtcag atggttcctt ctttctgtac agtaaactga ccgtggacaa gtccaggtgg 900
cagcagggga acgtcttttc ctgcagcgtg atgcatgagg ccctgcacaa tcattacaca 960
cagaaatctc tgagtctgtc accaggaaag 990

<210> 48
<211> 330
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность CH

<400> 48

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Leu Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Cys Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 49
<211> 330
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность CH

<400> 49

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Leu Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Arg Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 50
<211> 312
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность VL

<400> 50
gatatccagc tgaccagag ccctagcagc ctgagcgcta gcgtgggcga cagggtgagc 60
atcacctgca aggccagcca ggacgtgtcc atcgccgtgg cctggtatca acagaagccc 120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacagc gccagctaca ggtacaccgg cgtgcccagc 180
agatttagcg gcagcggctc cggcacagac ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240
gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag cactacatca cccccctgac ctttggcgcc 300
ggcaccaaag tg 312

<210> 51
<211> 104
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность VL

<400> 51

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val
100

<210> 52
<211> 360
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность VH

<400> 52
gtgcagctgc agcagtcgag cagcgagctg aagaagcctg ggcgagcgt gaaggtgagc 60
tgcaaggcca gcggctacac cttaccaaac tacggcatga actgggtgaa gcaggcccct 120
ggccagggac tgaagtggat gggctggatc aacacctaca ccggcgagcc cacctacacc 180
gacgacttca agggcagggtt cgccttcagc ctggacacca gcgtgtccac cgcctacctg 240
cagatctcca gcctgaaggc cgacgacacc gccgtgtact tctgcgccag aggcggcttc 300
ggcagcagct actggtactt cgacgtgtgg ggccagggaa gcctggtgac cgtgagcagc 360

<210> 53
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность VH

<400> 53

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

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

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

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 54
<211> 990
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность CH

<400> 54
gcttcaacaa aaggaccttc cgtgtttcca ctggcaccct ctagtaagag tacttcagga 60
ggaaccgcag cactgggatg tctggtgaag gactacttcc cagagcccgt caccgtgtct 120
tggaacagtg gagcactgac ctccggggtc catacatttc ctgccgtgct gcagtcatcc 180
ggtctgtata gcctgagctc tgtggtcaca gtcccaagtt catccctggg caccagaca 240
tacatctgca acgtgaatca caaaccttcc aatactaagg tcgacaagaa agtggaaacca 300
aaaagctgtg ataagactca tacctgccc ccttgtcctg caccagagct gctgggaggt 360
ccaagcgtgt tcctgtttcc acccaagccc aaagacacac tgatgatttc tcgcacaccc 420
gaagtcactt gtgtggctgt ggacgtgtcc cagcaggatc ctgaagtcaa gttcaactgg 480
tacgtggatg gcgtcgaggt gcataatgct aagaccaaac ccagagagga acagtacaac 540
agcacctatc gcgtcgtgtc tgtcctgaca gtgctgcacc aggattggct gaacggaaag 600
gagtacaagt gcaaagtgag caacaaggcc ctgcccgtc ctatcgagaa gaccatttct 660
aaggctaaag gccagcctag agaaccacag gtgtatacac tgcctccaag tcgcgacgag 720
ctgacaaaaa accaggtctc cctgccctgt ctggtgaagg gattctaccc tagcgatatc 780
gcagtggagt ggaatctaa tgggcagcca gaaaacaatt ataagaccac accccctgtg 840
ctgaactcag atggttcctt ctttctgtac agtaaactga ccgtggacaa gtccaggtgg 900
cagcagggga acgtcttttc ctgcagcgtg atgcatgagg ccctgcacaa tcattacaca 960
cagaaatctc tgagtctgtc accaggaaag 990

<210> 55
<211> 330
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность CH

<400> 55

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Pro Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asn Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 56
<211> 312
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность VL

<400> 56
gacatccaga tgaccagag ccctagcagc ctgagcgcta gcgtgggcga cagggtgacc 60
atcacctgca gggccagcca ggatgtgagc accgctgtgg cctggatatca acagaagccc 120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacagc gccagcttcc tgtacagcgg cgtgcccagc 180
agatttagcg gcagcggcag cggcaccgat ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacctgtacc atcccgccac cttcggccag 300
ggaccaagg tg 312

<210> 57
<211> 104
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность VL

<400> 57

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
100

<210> 58
<211> 354
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность VH

<400> 58
gaggtgcagc tgggtggagag cggaggagga ctggtgcagc ctggaggatc cctgagactg 60
agctgcgccg ccagcggctt caccttcagc gacagctgga tccactgggt gagacaggcc 120
cctggcaagg gcctggaatg ggtggcctgg atctcccctt acggcggcag cacctactac 180
gccgacagcg tgaagggcag gttcaccatc agcgccgaca ccagcaagaa caccgcctac 240
ctgcagatga acagcctgag ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaagacac 300
tggcccggcg gattcgacta ctggggacag ggcaccctgg tgaccgtgag cgcc 354

<210> 59
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность VH

<400> 59

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

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

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 60
<211> 990
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность CH

<400> 60
gcttcaacaa aaggaccttc cgtgtttcca ctggcaccct ctagtaagag tacttcagga 60
ggaaccgcag cactgggatg tctggtgaag gactacttcc cagagcccgt caccgtgtct 120
tggaacagtg gagcactgac ctccggggtc catacatttc ctgccgtgct gcagtcatcc 180
ggctctgtata gcctgagctc tgtggtcaca gtcccaagtt catccctggg caccagaca 240
tacatctgca acgtgaatca caaaccttcc aataactaagg tcgacaagaa agtggaaacca 300
aaaagctgtg ataagactca tacctgcca cttgtcctg caccagagct gctgggaggt 360
ccaagcgtgt tcctgtttcc acccaagccc aaagacacac tgatgatttc tcgcacaccc 420
gaagtcactt gtgtggctgt ggacgtgtcc caccaggatc ctgaagtcaa gttcaactgg 480
tacgtggatg gcgtcgaggt gcataatgct aagaccaaac ccagagagga acagtacaac 540
agcacctatc gcgtcgtgtc tgtcctgaca gtgctgcacc aggattggct gaacggaaag 600
gagtacaagt gcaaagtgag caacaaggcc ctgcccgtc ctatcgagaa gaccatttct 660
aaggctaaag gccagcctag agaaccacag gtgtatacac tgcctccaag tcgcgacgag 720
ctgacaaaaa accaggtctc cctgtgggtgt ctgggtgaagg gattctaccc tagcgatata 780
gcagtggagt gggaatctaa tgggcagcca gaaaacaatt ataagaccac accccctgtg 840
ctgggatcag atggttcctt ctttctgtac agtaaactga ccgtggacaa gtccaggtgg 900
cagcagggga acgtcttttc ctgcagcgtg atgcatgagg ccctgcacaa tcattacaca 960
cagaaatctc tgagtctgtc accaggaaag 990

<210> 61
<211> 330
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность CH

<400> 61

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Gly Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 62
<211> 729
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность варибельной области

<400> 62
gatatcaagc tgcagcagag cgggtgcagaa ctggccagac ctggcgcttc agtgaaaatg 60
tcctgtaaga ctagcggcta cacattcact cgatatacca tgcactgggt gaagcagcgt 120
ccagggcagg gtctggagtg gatcggatat attaaccct ctcgcgggta caccaactat 180
aatcagaagt ttaaagacaa ggccacactg actaccgata agagctctag tactgcttac 240
atgcagctgt catccctgac cagcgaagac tctgcagtgt actattgcg ccgatactat 300
gacgatcatt actgtctgga ctactggggc cagggaaaca ctctgactgt cagctctgtg 360
gagggaggaa gtggaggttc aggaggatcc ggaggtagcg gaggagtgga cgatatccag 420
ctgaccagt ctcccgccat tatgtccgct agccctggcg agaaagtcac catgacatgc 480
agagccagtt catccgtgtc ctacatgaat tggatcagc agaaatctgg aacaagtcca 540
aagaggtgga tctacgacac ttctaaggtc gcaagtgggg tgcctatcg gttttctggg 600
agtggttcag gcacttcta cagcctgacc attagctcta tggaggccga agatgctgca 660
acctactatt gccagcagtg gagtagcaat cctctgacat ttggagcagg gactaaactg 720
gaactgaag 729

<210> 63
<211> 243
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность варибельной области

<400> 63

Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser
130 135 140

Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
145 150 155 160

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser
165 170 175

Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser
180 185 190

Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
195 200 205

Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
210 215 220

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
225 230 235 240

Glu Leu Lys

<210> 64
<211> 990
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность константной области

<400> 64
gcttcaacaa aaggaccttc cgtgtttcca ctggcaccct ctagtaagag tacttcagga 60
ggaaccgcag cactgggatg tctgggtgaag gactacttcc cagagcccgt caccgtgtct 120
tggaacagtg gagcactgac ctccggggtc catacatttc ctgccgtgct gcagtcatcc 180
ggctctgata gcctgagctc tgtggtcaca gtcccaagtt catccctggg caccagaca 240
tacatctgca acgtgaatca caaaccttcc aatactaagg tcgacaagaa agtggaaacca 300
aaaagctgtg ataagactca tacctgccc ccttgtcctg caccagagct gctgggaggt 360
ccaagcgtgt tcctgtttcc acccaagccc aaagacacac tgatgatttc tcgcacaccc 420
gaagtcactt gtgtggtcgt ggacgtgtcc cacgaggatc ctgaagtcaa gttcaactgg 480
tacgtggatg gcgtcgaggt gcataatgct aagaccaaac ccagagagga acagtacaac 540
agcacctatc gcgtcgtgtc tgtcctgaca gtgctgcacc aggattggct gaacggaaag 600
gagtacaagt gcaaagtgag caacaaggcc ctgcccgtc ctatcgagaa gaccatttct 660
aaggctaaag gccagcctag agaaccacag gtgtatacag gacctccaag tcgcgacgag 720
ctgacaaaaa accaggtctc cctgacttgt ctgggtgaagg gattctaccc tagcgatata 780
gcagtggagt gggaatctaa tgggcagcca gaaaacaatt ataagaccac acccctgtg 840
ctggactcag atggttcctt ctttctgctc agttgtctga ccgtggacaa gtccaggtgg 900
cagcagggga acgtcttttc ctgcagcgtg atgcatgagg ccctgcacaa tcattacaca 960
cagaaatctc tgagtctgtc accaggaaag 990

<210> 65
<211> 990
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность константной области

<400> 65
gcttcaacaa aaggaccttc cgtgtttcca ctggcaccct ctagtaagag tacttcagga 60
ggaaccgcag cactgggatg tctgggtgaag gactacttcc cagagcccgt caccgtgtct 120
tggaacagtg gagcactgac ctccggggtc catacatttc ctgccgtgct gcagtcatcc 180
ggctctgata gcctgagctc tgtggtcaca gtcccaagtt catccctggg caccagaca 240
tacatctgca acgtgaatca caaaccttcc aatactaagg tcgacaagaa agtggaaacca 300

aaaagctgtg ataagactca tacctgcca cttgtcctg caccagagct gctgggaggt 360
 ccaagcgtgt tcctgtttcc acccaagccc aaagacacac tgatgatttc tcgcacaccc 420
 gaagtcactt gtgtggcgt ggacgtgtcc cacgaggatc ctgaagtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggatg gcgtcgaggt gcataatgct aagaccaaac ccagagagga acagtacaac 540
 agcacctatc gcgtcgtgtc tgtcctgaca gtgctgcacc aggattggct gaacggaaag 600
 gagtacaagt gcaaagtgag caacaaggcc ctgcccgtc ctatcgagaa gaccatttct 660
 aaggctaaag gccagcctag agaaccacag gtgtatacat atcctccaag tcgcgacgag 720
 ctgacaaaaa accaggtctc cctgacttgt ctggtgaagg gattctaccc tagcgatatac 780
 gcagtggagt gggaaatctaa tgggcagcca gaaaacaatt ataagaccac accccctgtg 840
 ctggactcag atggttcctt ctttctggca agtccctctga ccgtggacaa gtccaggtgg 900
 cagcagggga acgtcttttc ctgcagcgtg atgcatgagg ccctgcacaa tcattacaca 960
 cagaaatctc tgagtctgtc accaggaaag 990

<210> 66
 <211> 990
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Последовательность константной области

<400> 66
 gcttcaaaa aaggaccttc cgtgtttcca ctggcaccct ctagtaagag tacttcagga 60
 ggaaccgcag cactgggatg tctggtgaag gactacttcc cagagcccgt caccgtgtct 120
 tggaacagtg gagcactgac ctccggggtc catacatttc ctgccgtgct gcagtcattc 180
 ggtctgtata gcctgagctc tgtggtcaca gtcccaagtt catccctggg caccagaca 240
 tacatctgca acgtgaatca caaaccttcc aataactaagg tcgacaagaa agtggaaacca 300
 aaaagctgtg ataagactca tacctgcca cttgtcctg caccagagct gctgggaggt 360
 ccaagcgtgt tcctgtttcc acccaagccc aaagacacac tgatgatttc tcgcacaccc 420
 gaagtcactt gtgtggcgt ggacgtgtcc cacgaggatc ctgaagtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggatg gcgtcgaggt gcataatgct aagaccaaac ccagagagga acagtacaac 540
 agcacctatc gcgtcgtgtc tgtcctgaca gtgctgcacc aggattggct gaacggaaag 600
 gagtacaagt gcaaagtgag caacaaggcc ctgcccgtc ctatcgagaa gaccatttct 660
 aaggctaaag gccagcctag agaaccacag gtgtatacag ttcctccaag tcgcgacgag 720
 ctgacaaaaa accaggtctc cctgacttgt ctggtgaagg gattctaccc tagcgatatac 780
 gcagtggagt gggaaatctaa tgggcagcca gaaaacaatt ataagaccac accccctgtg 840
 ctggactcag atggttcctt ctttctggca agttcactga ccgtggacaa gtccaggtgg 900

cagcagggga acgtcttttc ctgcagcgtg atgcatgagg ccctgcacaa tcattacaca 960
cagaaatctc tgagtctgtc accaggaaag 990

<210> 67
<211> 990
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность константной области

<400> 67
gcttcaacaa aaggacctc cgtgtttcca ctggcaccct ctagtaagag tacttcagga 60
ggaaccgcag cactgggatg tctgggtgaag gactacttcc cagagcccgt caccgtgtct 120
tggaacagtg gagcactgac ctccggggtc catacatttc ctgccgtgct gcagtcatcc 180
ggctctgtata gcctgagctc tgtggtcaca gtcccaagtt catccctggg caccagaca 240
tacatctgca acgtgaatca caaaccttcc aatactaagg tcgacaagaa agtggaaacca 300
aaaagctgtg ataagactca tacctgcccc cttgtcctg caccagagct gctgggaggt 360
ccaagcgtgt tctgttttc acccaagccc aaagacacac tgatgatttc tcgcacaccc 420
gaagtcactt gtgtggctgt ggacgtgtcc cagcaggatc ctgaagtcaa gttcaactgg 480
tacgtggatg gcgtcgaggt gcataatgct aagaccaaac ccagagagga acagtacaac 540
agcacctatc gcgtcgtgtc tgtcctgaca gtgctgcacc aggattggct gaacggaaag 600
gagtacaagt gcaaagtgag caacaaggcc ctgcccgtc ctatcgagaa gaccatttct 660
aaggctaaag gccagcctag agaaccacag gtgtatacag atcctccaag tcgcgacgag 720
ctgacaaaaa accaggtctc cctgacttgt ctgggtgaagg gattctaccc tagcgatatc 780
gcagtggagt gggaaatctaa tgggcagcca gaaaacaatt ataagaccac accccctgtg 840
ctggactcag atggttcctt ctttctgcca agtagtctga ccgtggacaa gtccaggtgg 900
cagcagggga acgtcttttc ctgcagcgtg atgcatgagg ccctgcacaa tcattacaca 960
cagaaatctc tgagtctgtc accaggaaag 990

<210> 68
<211> 330
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность константной области

<400> 68

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Gly Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Leu Ser Cys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 69

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Последовательность константной области

<400> 69

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Tyr Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Ala Ser Pro Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 70

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Последовательность константной области

<400> 70

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Val Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Pro Ser Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 71
<211> 330
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Последовательность константной области

<400> 71

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Asp Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Pro Ser Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 72
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Синтетическая

<400> 72

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 73
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Легкая цепь против CD20 гомодимера против CD20

<400> 73

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 74

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Тяжелая цепь против CD20 гомодимера против CD20

<400> 74

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

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

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

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

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

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

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

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Leu Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Arg Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 75
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Легкая цепь против HER2 гомодимера против HER2

<400> 75

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 76

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Тяжелая цепь против HER2 гомодимера против HER2

<400> 76

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

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

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Glu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Leu Ser Val Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 77

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Легкая цепь против CD20 гетеродимера против CD20/HER2

<400> 77

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 78

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Тяжелая цепь против CD20 гетеродимера против CD20/HER2

<400> 78

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

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

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

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

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

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

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

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Leu Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Arg Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 79
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Легкая цепь против HER2 гетеродимера против CD20/HER2

<400> 79

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 80

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Тяжелая цепь против HER2 гетеродимера против CD20/HER2

<400> 80

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

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

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Glu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Leu Ser Val Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гетеродимер, содержащий элемент, связывающийся с Fc-рецептором (FcR), и одну или более чем одну распознающую группировку, ковалентно связанную с элементом, связывающимся с FcR, где указанный элемент, связывающийся с FcR, содержит первый полипептид и второй полипептид, соединенные друг с другом одной или более чем одной дисульфидной связью, каждый из которых содержит по меньшей мере часть константной области тяжелой цепи иммуноглобулина; и где указанные первый полипептид и второй полипептид содержат по меньшей мере пять аминокислотных замен в следующих положениях по нумерации Kabat EU:

а) T366 и D399 в первом полипептиде и L351, Y407 и K409 во втором полипептиде;
или

б) T366 и K409 в первом полипептиде и L351, D399 и Y407 во втором полипептиде;
благодаря чему первый и второй полипептиды имеют более высокую склонность к димеризации друг с другом, чем сами с собой.

2. Гетеродимер по п. 1, где по меньшей мере пять аминокислотных замен присутствуют в двух доменах СНЗ константной области тяжелой цепи иммуноглобулина как первого полипептида, так и второго полипептида.

3. Гетеродимер по любому из п.п. 1-2, где по меньшей мере пять аминокислотных замен включают по меньшей мере одно из следующего:

а) L351G, L351Y, L351V, L351P, L351D, L351E, L351K или L351W;

б) T366L, T366P, T366W или T366V;

с) D399C, D399N, D399I, D399G, D399R, D399T или D399A;

д) Y407L, Y407A, Y407P, Y407F, Y407T или Y407H; и

е) K409C, K409P, K409S, K409F, K409V, K409Q или K409R.

4. Гетеродимер по любому из п.п. 1-3, где по меньшей мере пять аминокислотных замен включают любую из следующих комбинаций любого элемента каждой из группы I(a)-(h) и группы II(a)-(h):

группа I:

а) T366L в первом полипептиде и L351E, Y407L во втором полипептиде;

б) T366L в первом полипептиде и L351G, Y407L во втором полипептиде;

с) T366L в первом полипептиде и L351Y, Y407A во втором полипептиде;

д) T366P в первом полипептиде и L351V, Y407P во втором полипептиде;

е) T366W в первом полипептиде и L351D, Y407P во втором полипептиде;

ф) T366P в первом полипептиде и L351P, Y407F во втором полипептиде;

g) T366V в первом полипептиде и L351K, Y407T во втором полипептиде; и

h) T366L в первом полипептиде и L351W, Y407H во втором полипептиде;

группа II:

a) D399R в первом полипептиде и K409V во втором полипептиде;

b) D399C в первом полипептиде и K409C во втором полипептиде;

c) D399C в первом полипептиде и K409P во втором полипептиде;

d) D399N в первом полипептиде и K409S во втором полипептиде;

e) D399G в первом полипептиде и K409S во втором полипептиде;

f) D399I в первом полипептиде и K409F во втором полипептиде;

g) D399T в первом полипептиде и K409Q во втором полипептиде; и

h) D399A в первом полипептиде и K409R во втором полипептиде.

5. Гетеродимер по любому из п.п. 1-3, где по меньшей мере пять аминокислотных замен включают любую из следующих комбинаций любого элемента каждой из группы III(a)-(h) и группы IV(a)-(h):

группа III:

a) T366L в первом полипептиде и L351E, Y407L во втором полипептиде;

b) T366L в первом полипептиде и L351G, Y407L во втором полипептиде;

c) T366L в первом полипептиде и L351Y, Y407A во втором полипептиде;

d) T366P в первом полипептиде и L351V, Y407P во втором полипептиде;

e) T366W в первом полипептиде и L351D, Y407P во втором полипептиде;

f) T366P в первом полипептиде и L351P, Y407F во втором полипептиде;

g) T366V в первом полипептиде и L351K, Y407T во втором полипептиде; и

h) T366L в первом полипептиде и L351W, Y407H во втором полипептиде;

группа IV:

a) K409V в первом полипептиде и D399R во втором полипептиде;

b) K409C в первом полипептиде и D399C во втором полипептиде;

c) K409P в первом полипептиде и D399C во втором полипептиде;

d) K409S в первом полипептиде и D399N во втором полипептиде;

e) K409S в первом полипептиде и D399G во втором полипептиде;

f) K409F в первом полипептиде и D399I во втором полипептиде;

g) K409Q в первом полипептиде и D399T во втором полипептиде; и

h) K409R в первом полипептиде и D399A во втором полипептиде.

6. Гетеродимер по любому из п.п. 1-4, где по меньшей мере пять аминокислотных замен включают любой из следующих элементов группы V(a)-(h):

группа V:

a) T366L и D399R в первом полипептиде и L351E, Y407L и K409V во втором полипептиде;

b) T366L и D399C в первом полипептиде и L351G, Y407L и K409C во втором полипептиде;

c) T366L и D399C в первом полипептиде и L351Y, Y407A и K409P во втором полипептиде;

d) T366P и D399N в первом полипептиде и L351V, Y407P и K409S во втором полипептиде;

e) T366W и D399G в первом полипептиде и L351D, Y407P и K409S во втором полипептиде;

f) T366P и D399I в первом полипептиде и L351P, Y407F и K409F во втором полипептиде;

g) T366V и D399T в первом полипептиде и L351K, Y407T и K409Q во втором полипептиде; и

h) T366L и D399A в первом полипептиде и L351W, Y407H и K409R во втором полипептиде.

7. Гетеродимер по любому из п.п. 1-3 и 5, где по меньшей мере пять аминокислотных замен включают любой из следующих элементов группы VI(a)-(h):

группа VI:

a) T366L и K409V в первом полипептиде и L351E, Y407L и D399R во втором полипептиде;

b) T366L и K409C в первом полипептиде и L351G, Y407L и D399C во втором полипептиде;

c) T366L и K409P в первом полипептиде и L351Y, Y407A и D399C во втором полипептиде;

d) T366P и K409S в первом полипептиде и L351V, Y407P и D399N во втором полипептиде;

e) T366W и K409S в первом полипептиде и L351D, Y407P и D399G во втором полипептиде;

f) T366P и K409F в первом полипептиде и L351P, Y407F и D399I во втором полипептиде;

g) T366V и K409Q в первом полипептиде и L351K, Y407T и D399T во втором полипептиде; и

h) T366L и K409R в первом полипептиде и L351W, Y407H и D399A во втором полипептиде.

8. Гетеродимер по любому из п.п. 1-7, где элемент, связывающийся с FcR, содержит Fc-домен.

9. Гетеродимер по п. 8, где Fc-домен имеет происхождение от Fc-домена IgG.

10. Гетеродимер по п. 9, где Fc-домен IgG включает Fc-домен, выбранный из группы, состоящей из Fc-домена IgG1, Fc-домена IgG2, Fc-домена IgG3 и Fc-домена IgG4.

11. Гетеродимер по любому из п.п. 1-10, где одна или более чем одна распознающая группировка содержит по меньшей мере один из антигенсвязывающих (Fab) фрагментов, одноцепочечных вариабельных (scFv) фрагментов, внеклеточных доменов мембранных рецепторов, пептидных лигандов клеточных мембранных рецепторов, цитокинов, факторов свертывания, аффинных меток и их комбинаций.

12. Гетеродимер по п. 11, где одна или более чем одна распознающая группировка содержит две распознающие группировки, каждая из которых содержит Fab-фрагменты.

13. Гетеродимер по п. 12, где два Fab-фрагмента неидентичны.

14. Гетеродимер по п. 13, содержащий иммуноглобулиноподобную молекулу.

15. Гетеродимер по любому из п.п. 13-14, содержащий биспецифичное антитело.

16. Гетеродимер по п. 11, где одна или более чем одна распознающая группировка содержит две распознающие группировки, содержащие Fab-фрагмент и scFv-фрагмент.

17. Гетеродимер по любому из п.п. 1-16, где в физиологических условиях в водном растворе, содержащем 1 мМ дитиотреитола, в гомодимерной форме существует менее чем 50% по массе только одного из первого и второго полипептидов и когнатной распознающей группировки указанного первого или второго полипептида, исходя из массы всех полипептидных форм в растворе, при условии, что указанный раствор по существу свободен от полипептидов, отличных от указанных первого или второго полипептида и его когнатной распознающей группировки.

18. Гетеродимер по любому из п.п. 1-17, где по меньшей мере пять аминокислотных замен включают T366L и D399R в первом полипептиде и L351E, Y407L и K409V во втором полипептиде.

19. Гетеродимер по п. 13, содержащий первую тяжелую цепь и вторую тяжелую цепь, и первую легкую цепь и вторую легкую цепь, где первая тяжелая цепь и вторая тяжелая цепь неидентичны, и где первая легкая цепь и вторая легкая цепь неидентичны.

20. Гетеродимер по п. 16, где Fab-фрагмент и scFv-фрагмент выбраны из пары распознающих группировок, выбранных из группы VII(a)-(d):

группа VII:

- a) Fab, специфично связывающийся с HER2, и scFv, специфично связывающийся с CD3;
- b) Fab, специфично связывающийся с Троп-2, и scFv, специфично связывающийся с CD3;
- c) Fab, специфично связывающийся с CD20, и scFv, специфично связывающийся с CD3; и
- d) Fab, специфично связывающийся с PD-L1, и scFv, специфично связывающийся с CD3.

21. Гетеродимер по п. 13, где два неидентичных Fab-фрагмента включают первый Fab-фрагмент, специфично связывающийся с HER2, и второй Fab-фрагмент, специфично связывающийся с CD20.

22. Гетеродимер по любому из п.п. 1-21, где по меньшей мере один из первого полипептида и второго полипептида имеет аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну из SEQ ID NO:16-31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 48, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 68, 69, 70 и 71.

23. Гетеродимер по любому из п.п. 1-22, где элемент, связывающийся с FcR, способен связываться с Fc-рецептором, выбранным из группы, состоящей из FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB1, FcγRIIB2, FcγRIIIA, FcγRIIIB, FcεRI, FcεRII, FcαRI, Fcα/μR, FcRn и их комбинаций.

24. Гетеродимер по п. 23, где элемент, связывающийся с FcR, способен связываться с FcRn.

25. Гетеродимер по п. 23, где связывание с Fc-рецептором запускает ADCC (антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность).

26. Способ получения гетеродимера по любому из п.п. 1-25, включающий:

- 1) экспрессию одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей первый полипептид, в первой клетке-хозяине и одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей второй полипептид, во второй клетке-хозяине, где первая клетка-хозяин и вторая клетка-хозяин отделены друг от друга;
- 2) восстановление первого полипептида и второго полипептида, когда они разделены;
- 3) объединение первого полипептида и второго полипептида с получением смеси;
- 4) окисление полученной смеси; и
- 5) выделение образованного гетеродимера.

27. Способ получения гетеродимера, содержащего бивалентный гетерологичный иммуноглобулин, имеющий первую тяжелую цепь, вторую тяжелую цепь, первую легкую цепь и вторую легкую цепь, где первая тяжелая цепь и вторая тяжелая цепь неидентичны, где первая легкая цепь и вторая легкая цепь неидентичны, где часть первой тяжелой цепи и второй тяжелой цепи образуют Fc-область бивалентного гетерологичного иммуноглобулина, включающий:

1) экспрессию одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, в первой клетке-хозяине и одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, во второй клетке-хозяине, где первая клетка-хозяин и вторая клетка-хозяин отделены друг от друга;

2) восстановление первой тяжелой цепи и первой легкой цепи совместно и второй тяжелой цепи и второй легкой цепи совместно;

3) объединение первой тяжелой цепи, первой легкой цепи, второй тяжелой цепи и второй легкой цепи с получением смеси;

4) окисление полученной смеси; и

5) выделение образованного гетеродимера;

где Fc-область содержит по меньшей мере пять аминокислотных замен, включающих любую из следующих комбинаций любого элемента каждой из группы VIII(a)-(h) и группы IX(a)-(h):

группа VIII:

a) T366L в первой тяжелой цепи и L351E, Y407L во второй тяжелой цепи;

b) T366L в первой тяжелой цепи и L351G, Y407L во второй тяжелой цепи;

c) T366L в первой тяжелой цепи и L351Y, Y407A во второй тяжелой цепи;

d) T366P в первой тяжелой цепи и L351V, Y407P во второй тяжелой цепи;

e) T366W в первой тяжелой цепи и L351D, Y407P во второй тяжелой цепи;

f) T366P в первой тяжелой цепи и L351P, Y407F во второй тяжелой цепи;

g) T366V в первой тяжелой цепи и L351K, Y407T во второй тяжелой цепи; и

h) T366L в первой тяжелой цепи и L351W, Y407H во второй тяжелой цепи;

группа IX:

a) D399R в первой тяжелой цепи и K409V во второй тяжелой цепи;

b) D399C в первой тяжелой цепи и K409C во второй тяжелой цепи;

c) D399C в первой тяжелой цепи и K409P во второй тяжелой цепи;

d) D399N в первой тяжелой цепи и K409S во второй тяжелой цепи;

- e) D399G в первой тяжелой цепи и K409S во второй тяжелой цепи;
- f) D399I в первой тяжелой цепи и K409F во второй тяжелой цепи;
- g) D399T в первой тяжелой цепи и K409Q во второй тяжелой цепи; и
- h) D399A в первой тяжелой цепи и K409R во второй тяжелой цепи.

28. Способ получения гетеродимера, содержащего бивалентный гетерологичный иммуноглобулин, имеющий первую тяжелую цепь, вторую тяжелую цепь, первую легкую цепь и вторую легкую цепь, где первая тяжелая цепь и вторая тяжелая цепь неидентичны, где первая легкая цепь и вторая легкая цепь неидентичны, где часть первой тяжелой цепи и второй тяжелой цепи образуют Fc-область бивалентного гетерологичного иммуноглобулина, включающий:

1) экспрессию одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, в первой клетке-хозяине и одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, во второй клетке-хозяине, где первая клетка-хозяин и вторая клетка-хозяин отделены друг от друга;

2) восстановление первой тяжелой цепи и первой легкой цепи совместно и второй тяжелой цепи и второй легкой цепи совместно;

3) объединение первой тяжелой цепи, первой легкой цепи, второй тяжелой цепи и второй легкой цепи с получением смеси;

4) окисление полученной смеси; и

5) выделение образованного гетеродимера;

где Fc-область содержит по меньшей мере пять аминокислотных замен, включающих любую из следующих комбинаций любого элемента каждой из группы XII(a)-(h) и группы XIII(a)-(h):

группа XII:

- a) T366L в первой тяжелой цепи и L351E, Y407L во второй тяжелой цепи;
- b) T366L в первой тяжелой цепи и L351G, Y407L во второй тяжелой цепи;
- c) T366L в первой тяжелой цепи и L351Y, Y407A во второй тяжелой цепи;
- d) T366P в первой тяжелой цепи и L351V, Y407P во второй тяжелой цепи;
- e) T366W в первой тяжелой цепи и L351D, Y407P во второй тяжелой цепи;
- f) T366P в первой тяжелой цепи и L351P, Y407F во второй тяжелой цепи;
- g) T366V в первой тяжелой цепи и L351K, Y407T во второй тяжелой цепи; и
- h) T366L в первой тяжелой цепи и L351W, Y407H во второй тяжелой цепи;

группа XIII:

- a) K409V в первой тяжелой цепи и D399R во второй тяжелой цепи;
- b) K409C в первой тяжелой цепи и D399C во второй тяжелой цепи;
- c) K409P в первой тяжелой цепи и D399C во второй тяжелой цепи;
- d) K409S в первой тяжелой цепи и D399N во второй тяжелой цепи;
- e) K409S в первой тяжелой цепи и D399G во второй тяжелой цепи;
- f) K409F в первой тяжелой цепи и D399I во второй тяжелой цепи;
- g) K409Q в первой тяжелой цепи и D399T во второй тяжелой цепи; и
- h) K409R в первой тяжелой цепи и D399A во второй тяжелой цепи.

29. Способ получения гетеродимера, содержащего бивалентный гетерологичный белок, содержащий тяжелую цепь, легкую цепь и scFv-фрагмент, связанный с Fc-цепью, где часть тяжелой цепи и Fc-цепи, связанной с scFv-фрагментом, образуют Fc-область, включающий:

1) экспрессию одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь и легкую цепь, и одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей scFv-фрагмент, связанный с Fc-цепью, в клетке-хозяине; и

2) выделение образованного гетеродимера;

где Fc-область содержит по меньшей мере пять аминокислотных замен, включающих любую из следующих комбинаций любого элемента каждой из группы XIV(a)-(h) и группы XV(a)-(h):

группа XIV:

- a) T366L в первой тяжелой цепи и L351E, Y407L во второй тяжелой цепи;
- b) T366L в первой тяжелой цепи и L351G, Y407L во второй тяжелой цепи;
- c) T366L в первой тяжелой цепи и L351Y, Y407A во второй тяжелой цепи;
- d) T366P в первой тяжелой цепи и L351V, Y407P во второй тяжелой цепи;
- e) T366W в первой тяжелой цепи и L351D, Y407P во второй тяжелой цепи;
- f) T366P в первой тяжелой цепи и L351P, Y407F во второй тяжелой цепи;
- g) T366V в первой тяжелой цепи и L351K, Y407T во второй тяжелой цепи; и
- h) T366L в первой тяжелой цепи и L351W, Y407H во второй тяжелой цепи;

группа XV:

- a) D399R в первой тяжелой цепи и K409V во второй тяжелой цепи;
- b) D399C в первой тяжелой цепи и K409C во второй тяжелой цепи;
- c) D399C в первой тяжелой цепи и K409P во второй тяжелой цепи;
- d) D399N в первой тяжелой цепи и K409S во второй тяжелой цепи;
- e) D399G в первой тяжелой цепи и K409S во второй тяжелой цепи;

- f) D399I в первой тяжелой цепи и K409F во второй тяжелой цепи;
- g) D399T в первой тяжелой цепи и K409Q во второй тяжелой цепи; и
- h) D399A в первой тяжелой цепи и K409R во второй тяжелой цепи.

30. Способ получения гетеродимера, содержащего бивалентный гетерологичный белок, содержащий тяжелую цепь, легкую цепь и scFv-фрагмент, связанный с Fc-цепью, где часть тяжелой цепи и Fc-цепи, связанной с scFv-фрагментом, образуют Fc-область, включающий:

1) экспрессию одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь и легкую цепь, и одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей scFv-фрагмент, связанный с Fc-цепью, в клетке-хозяине; и

2) выделение образованного гетеродимера;

где Fc-область содержит по меньшей мере пять аминокислотных замен, включающих любую из следующих комбинаций любого элемента каждой из группы XVI(a)-(h) и группы XVII(a)-(h):

группа XVI:

- a) T366L в первой тяжелой цепи и L351E, Y407L во второй тяжелой цепи;
- b) T366L в первой тяжелой цепи и L351G, Y407L во второй тяжелой цепи;
- c) T366L в первой тяжелой цепи и L351Y, Y407A во второй тяжелой цепи;
- d) T366P в первой тяжелой цепи и L351V, Y407P во второй тяжелой цепи;
- e) T366W в первой тяжелой цепи и L351D, Y407P во второй тяжелой цепи;
- f) T366P в первой тяжелой цепи и L351P, Y407F во второй тяжелой цепи;
- g) T366V в первой тяжелой цепи и L351K, Y407T во второй тяжелой цепи; или
- h) T366L в первой тяжелой цепи и L351W, Y407H во второй тяжелой цепи;

группа XVII:

- a) K409V в первой тяжелой цепи и D399R во второй тяжелой цепи;
- b) K409C в первой тяжелой цепи и D399C во второй тяжелой цепи;
- c) K409P в первой тяжелой цепи и D399C во второй тяжелой цепи;
- d) K409S в первой тяжелой цепи и D399N во второй тяжелой цепи;
- e) K409S в первой тяжелой цепи и D399G во второй тяжелой цепи;
- f) K409F в первой тяжелой цепи и D399I во второй тяжелой цепи;
- g) K409Q в первой тяжелой цепи и D399T во второй тяжелой цепи; и
- h) K409R в первой тяжелой цепи и D399A во второй тяжелой цепи.

31. Способ получения гетеродимера, содержащего бивалентный гетерологичный иммуноглобулин, имеющий первую тяжелую цепь, вторую тяжелую цепь, первую легкую

цепь и вторую легкую цепь, где первая тяжелая цепь и вторая тяжелая цепь неидентичны, где первая легкая цепь и вторая легкая цепь неидентичны, где часть первой тяжелой цепи и второй тяжелой цепи образуют Fc-область бивалентного гетерологичного иммуноглобулина, включающий:

1) экспрессию одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, в первой клетке-хозяине и одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, во второй клетке-хозяине, где первая клетка-хозяин и вторая клетка-хозяин отделены друг от друга;

2) восстановление первой тяжелой цепи и первой легкой цепи совместно и второй тяжелой цепи и второй легкой цепи совместно;

3) объединение первой тяжелой цепи, первой легкой цепи, второй тяжелой цепи и второй легкой цепи с получением смеси;

4) окисление полученной смеси; и

5) выделение образованного гетеродимера;

где Fc-область содержит по меньшей мере пять аминокислотных замен, включающих любой из следующих элементов группы X(a)-(h):

группа X:

a) T366L и D399R в первой тяжелой цепи и L351E, Y407L и K409V во второй тяжелой цепи;

b) T366L и D399C в первой тяжелой цепи и L351G, Y407L и K409C во второй тяжелой цепи;

c) T366L и D399C в первой тяжелой цепи и L351Y, Y407A и K409P во второй тяжелой цепи;

d) T366P и D399N в первой тяжелой цепи и L351V, Y407P и K409S во второй тяжелой цепи;

e) T366W и D399G в первом полипептиде и L351D, Y407P и K409S во второй тяжелой цепи;

f) T366P и D399I в первом полипептиде и L351P, Y407F и K409F во второй тяжелой цепи;

g) T366V и D399T в первой тяжелой цепи и L351K, Y407T и K409Q во второй тяжелой цепи; и

h) T366L и D399A в первой тяжелой цепи и L351W, Y407H и K409R во второй тяжелой цепи.

32. Способ получения гетеродимера, содержащего бивалентный гетерологичный иммуноглобулин, имеющий первую тяжелую цепь, вторую тяжелую цепь, первую легкую цепь и вторую легкую цепь, где первая тяжелая цепь и вторая тяжелая цепь неидентичны, где первая легкая цепь и вторая легкая цепь неидентичны, где часть первой тяжелой цепи и второй тяжелой цепи образуют Fc-область бивалентного гетерологичного иммуноглобулина, включающий:

1) экспрессию одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, в первой клетке-хозяине и одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, во второй клетке-хозяине, где первая клетка-хозяин и вторая клетка-хозяин отделены друг от друга;

2) восстановление первой тяжелой цепи и первой легкой цепи совместно и второй тяжелой цепи и второй легкой цепи совместно;

3) объединение первой тяжелой цепи, первой легкой цепи, второй тяжелой цепи и второй легкой цепи с получением смеси;

4) окисление полученной смеси; и

5) выделение образованного гетеродимера;

где Fc-область содержит по меньшей мере пять аминокислотных замен, включающих любой из следующих элементов группы XI(a)-(h):

группа XI:

a) T366L и K409V в первой тяжелой цепи и L351E, Y407L и D399R во второй тяжелой цепи;

b) T366L и K409C в первой тяжелой цепи и L351G, Y407L и D399C во второй тяжелой цепи;

c) T366L и K409P в первой тяжелой цепи и L351Y, Y407A и D399C во второй тяжелой цепи;

d) T366P и K409S в первой тяжелой цепи и L351V, Y407P и D399N во второй тяжелой цепи;

e) T366W и K409S в первой тяжелой цепи и L351D, Y407P и D399G во второй тяжелой цепи;

f) T366P и K409F в первой тяжелой цепи и L351P, Y407F и D399I во второй тяжелой цепи;

g) T366V и K409Q в первой тяжелой цепи и L351K, Y407T и D399T во второй тяжелой цепи; и

h) T366L и K409R в первой тяжелой цепи и L351W, Y407H и D399A во второй тяжелой цепи.

33. Способ по любому из п.п. 26-32, где одна или более чем одна нуклеиновая кислота содержится в векторе или системе векторов.

34. Способ по п. 33, где вектор или система векторов включает плазмидные векторы pX0GC, полученные модификацией векторов pCDNA.

35. Способ по п. 34, где вектор или систему векторов вводят в клетку или клетки.

36. Способ по п. 35, где клетка или клетки включают одну из клеток НЕК293, НЕК293Т, НЕК293F или CHO, CHO-S, CHO-dhfr⁻, CHO/DG44 и ExpiCHO.

37. Способ по любому из п.п. 26-28 и 31-32, где стадия восстановления включает:

1) добавление восстановителя, содержащего одно из 2-аминоэтантола, дитиотреитола (DTT), трис(2-карбоксиил)фосфина, их производных и их комбинаций;

2) восстановление на протяжении по меньшей мере приблизительно 3 часов при приблизительно 4°C; и

3) удаление восстановителя.

38. Способ по п. 37, где восстановитель содержит DTT в концентрации приблизительно 0,1 мМ или выше.

39. Способ по любому из п.п. 37-38, где восстановитель удаляют с использованием колонки для обессоливания.

40. Способ по любому из п.п. 26-28, 31-32 и 37-39, где стадия окисления включает окисление воздухом на протяжении по меньшей мере приблизительно 5 часов.

41. Способ по любому из п.п. 26-28, 31-32 и 37-39, где стадия окисления включает:

1) добавление окислителя, содержащего L-дегидроаскорбиновую кислоту, ее производные или их комбинации;

2) окисление на протяжении по меньшей мере приблизительно 5 часов при приблизительно 4°C; и

3) удаление окислителя.

42. Способ по п. 41, где окислитель содержит L-дегидроаскорбиновую кислоту в концентрации приблизительно 0,5 мМ или выше.

43. Способ по любому из п.п. 26-40, дополнительно включающий стадию разделения.

44. Нуклеиновая кислота, кодирующая по меньшей мере один из первого полипептида и второго полипептида по любому из п.п. 1-25.

45. Нуклеиновая кислота п. 44, содержащая по меньшей мере одну из SEQ ID NO:32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 47, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62 и 64-67.

46. Вектор или система векторов, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из п.п. 44-45.

47. Вектор или система векторов по п. 46, включающие плазмидные векторы pX0GC, полученные модификацией векторов pCDNA.

48. Клетка, содержащая вектор или систему векторов по любому из п.п. 46-47.

49. Клетка по п. 35, включающая одну из клеток НЕК293, НЕК293Т, НЕК293F или CHO, CHO-S, CHO-dhfr⁻, CHO/DG44 и ExpiCHO.

50. Фармацевтическая композиция, содержащая:

фармацевтически приемлемый носитель; и

одно из:

- 1) гетеродимера по любому из п.п. 1-25;
- 2) нуклеиновой кислоты по любому из п.п. 44-45;
- 3) вектора или системы векторов по любому из п.п. 46-47;
- 4) клетки по любому из п.п. 48-49; и
- 5) их комбинаций.

51. Способ лечения или предотвращения заболевания или расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту фармацевтической композиции по п. 50.

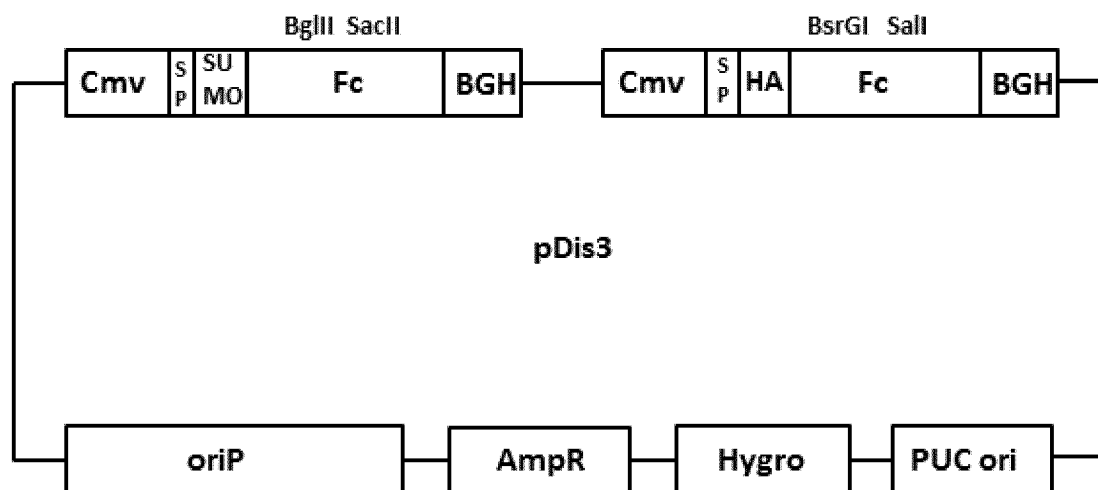
52. Способ по п. 51, где заболевание или расстройство включает одно или более из аутоиммунных заболеваний, иммунного ответа против трансплантатов, аллергических реакций, инфекций, нейродегенеративных заболеваний, опухолевых заболеваний и клеточных пролиферативных расстройств, артрита, ревматоидного артрита, псориаза, рассеянного склероза (РС), язвенного колита, болезни Крона, системной красной волчанки (СКВ), гломерулонефрита, заболеваний наподобие дилатационной кардиомиопатии, синдрома Шегрена, аллергического контактного дерматита, полимиозита, склеродермии, узелкового периартериита, ревматизма, витилиго, инсулинозависимого сахарного диабета, синдрома Бехчета, хронического тиреоидита, болезни Паркинсона, болезни Гентингтона, болезни Мачадо-Джозефа, бокового амиотрофического склероза (БАС), болезни Крейтцфельдта-Якоба, лейкоза, лимфомы, миеломы, опухолей головного мозга, плоскоклеточного рака головы и шеи, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака носоглотки, рака пищевода, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака печени, колоректального рака, рака молочной железы, рака яичника, рака

шейки матки, рака эндометрия, саркомы матки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, почечноклеточного рака, меланомы и их комбинаций.

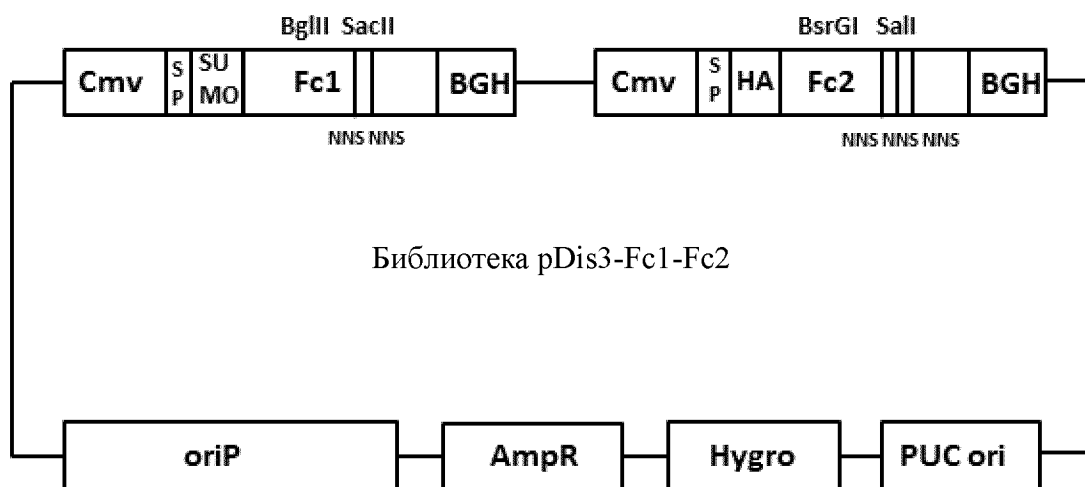
53. Способ по любому из п.п. 51-52, где субъект представляет собой человека.

ГРАФИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ

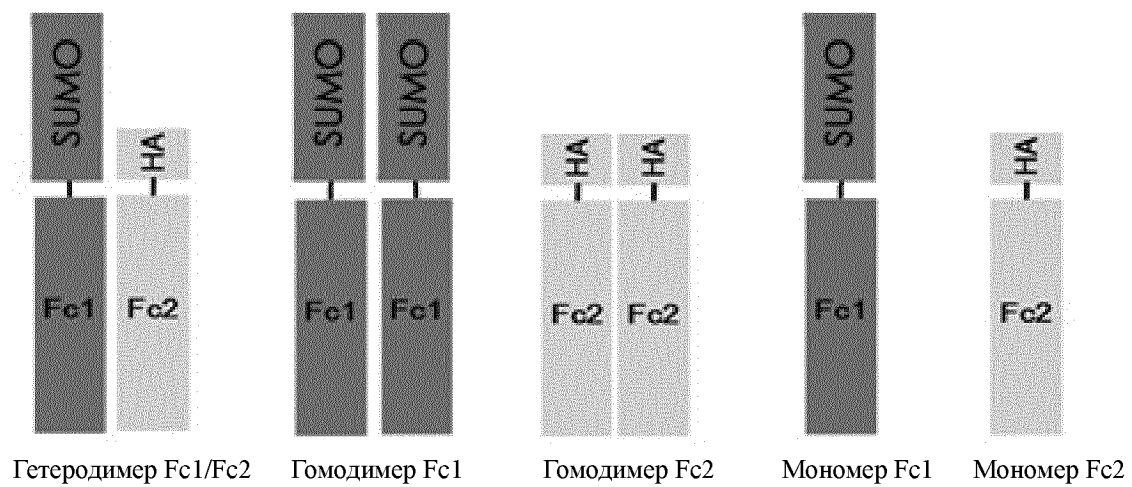
Фиг. 1



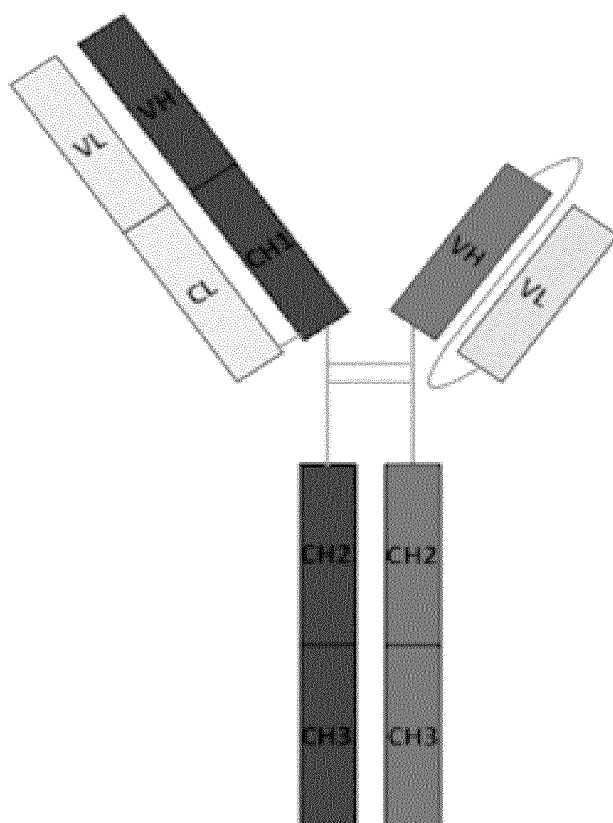
Фиг. 2



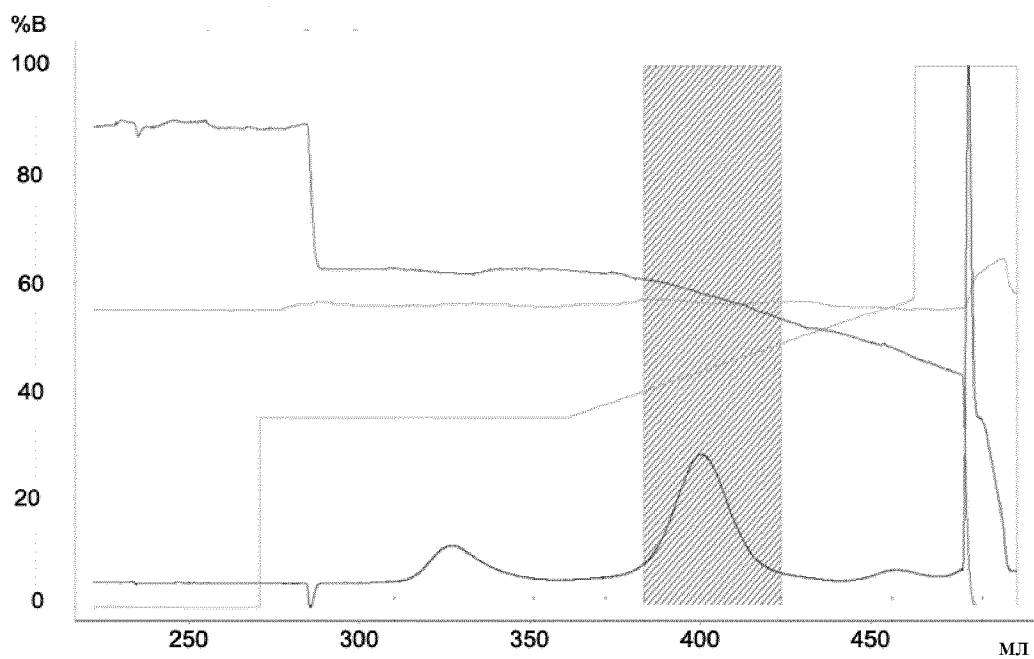
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

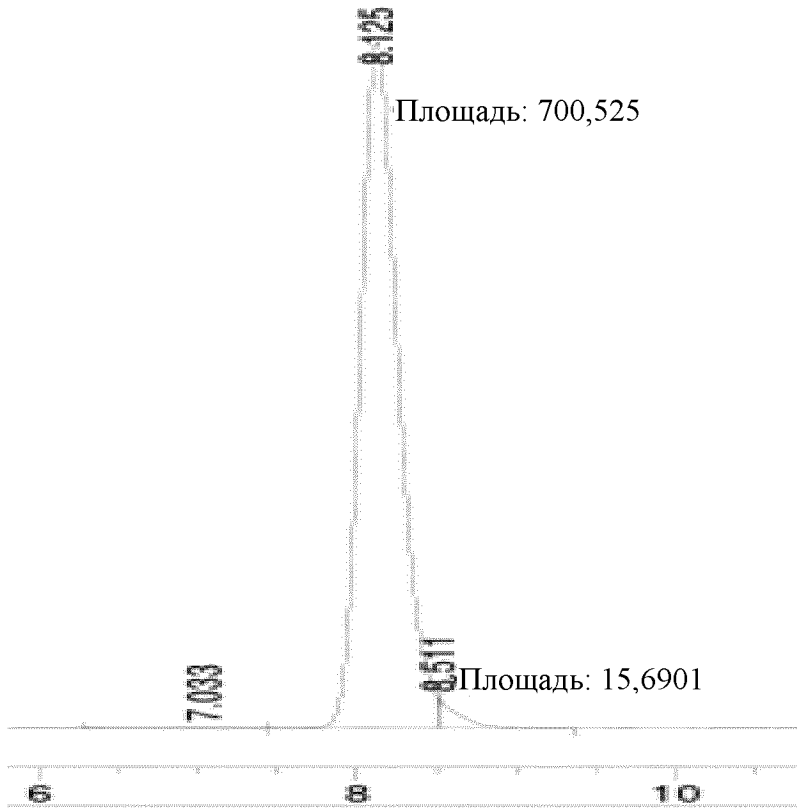


1. Стандарт молекулярной массы
2. Очищенное гетеродимерное антитело

1

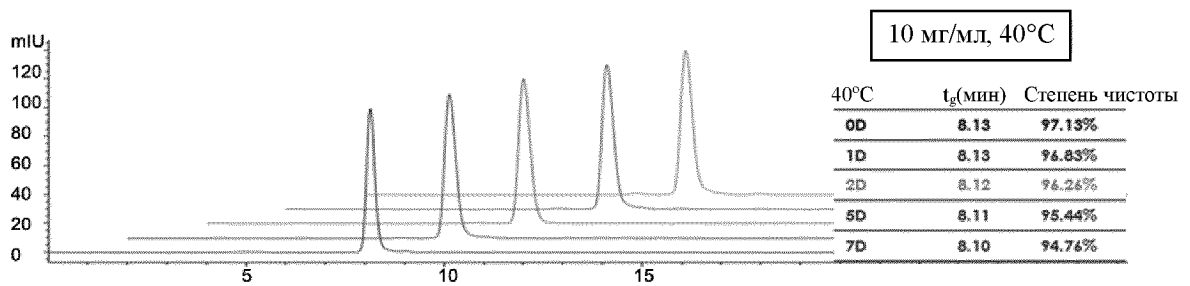
2

Фиг. 7

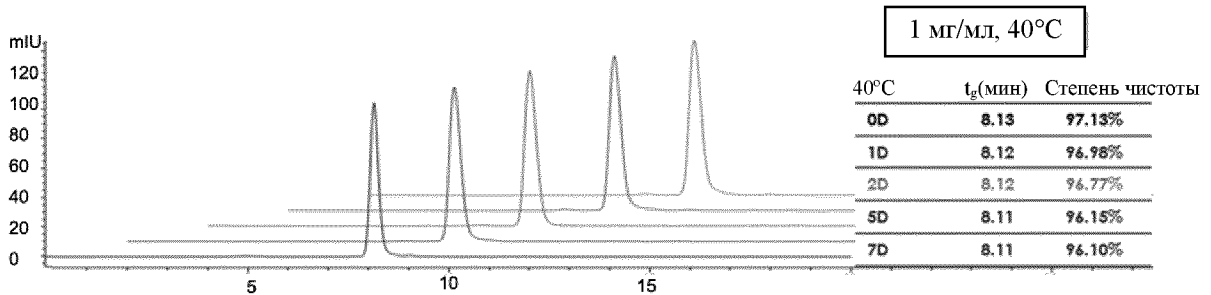


Фиг. 8

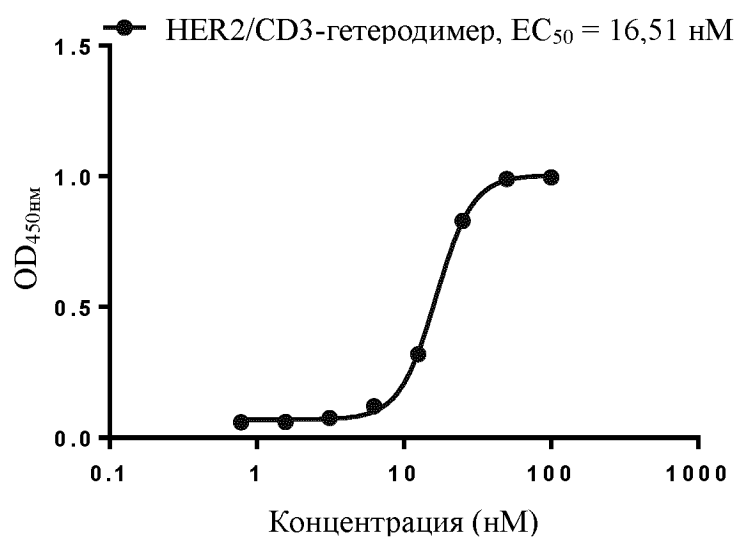
А



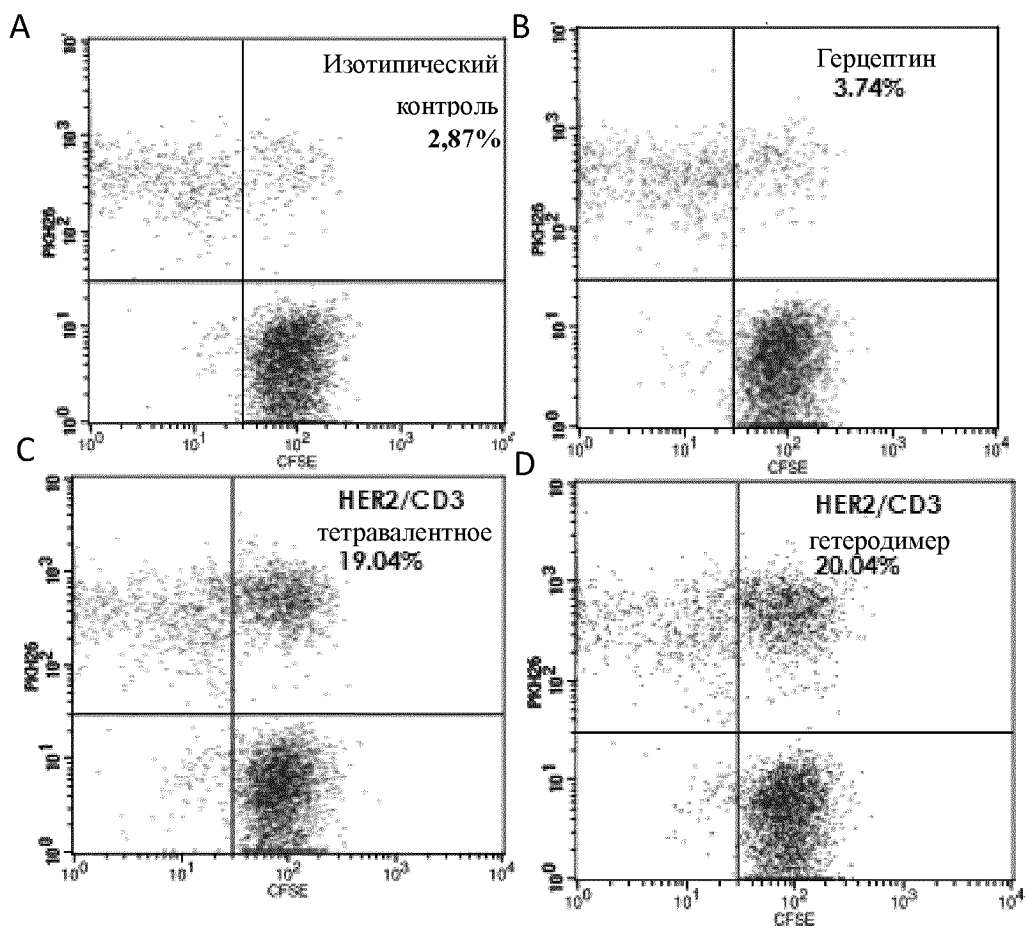
В



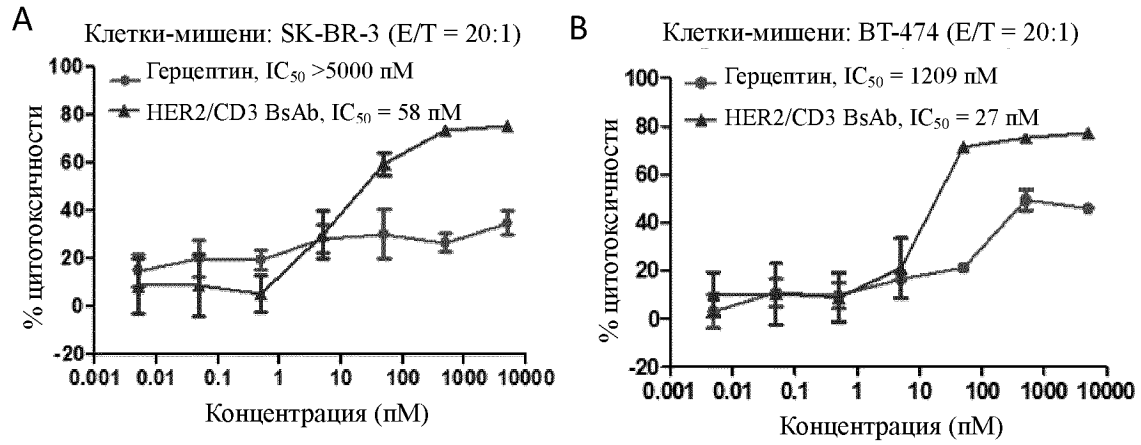
Фиг. 9



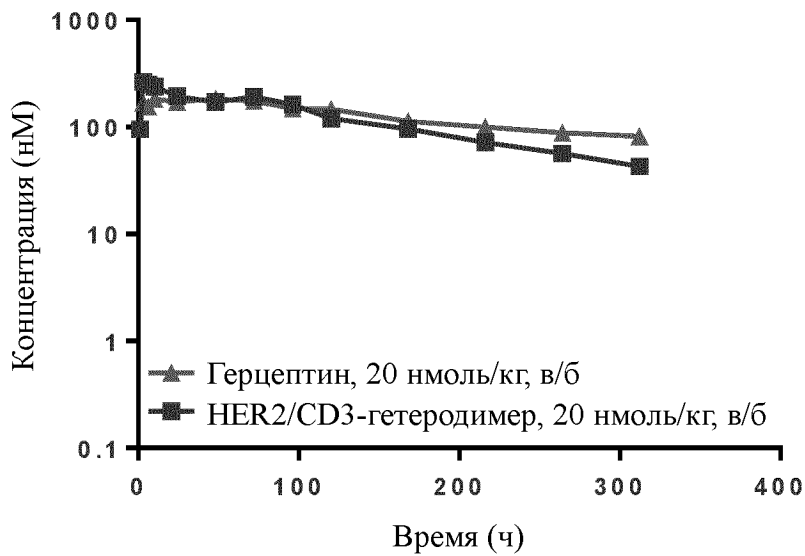
Фиг. 10



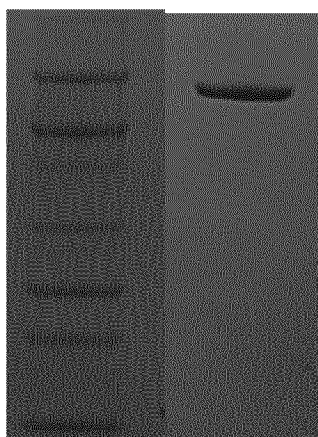
Фиг. 11



Фиг. 12



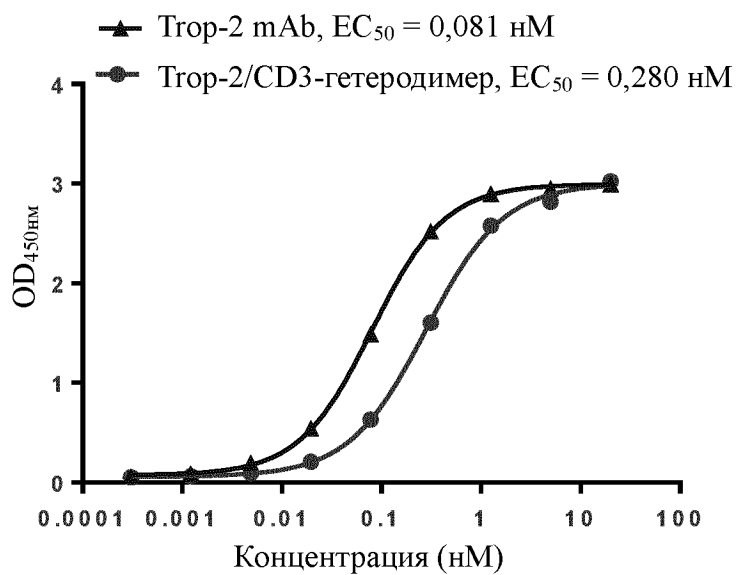
Фиг. 13



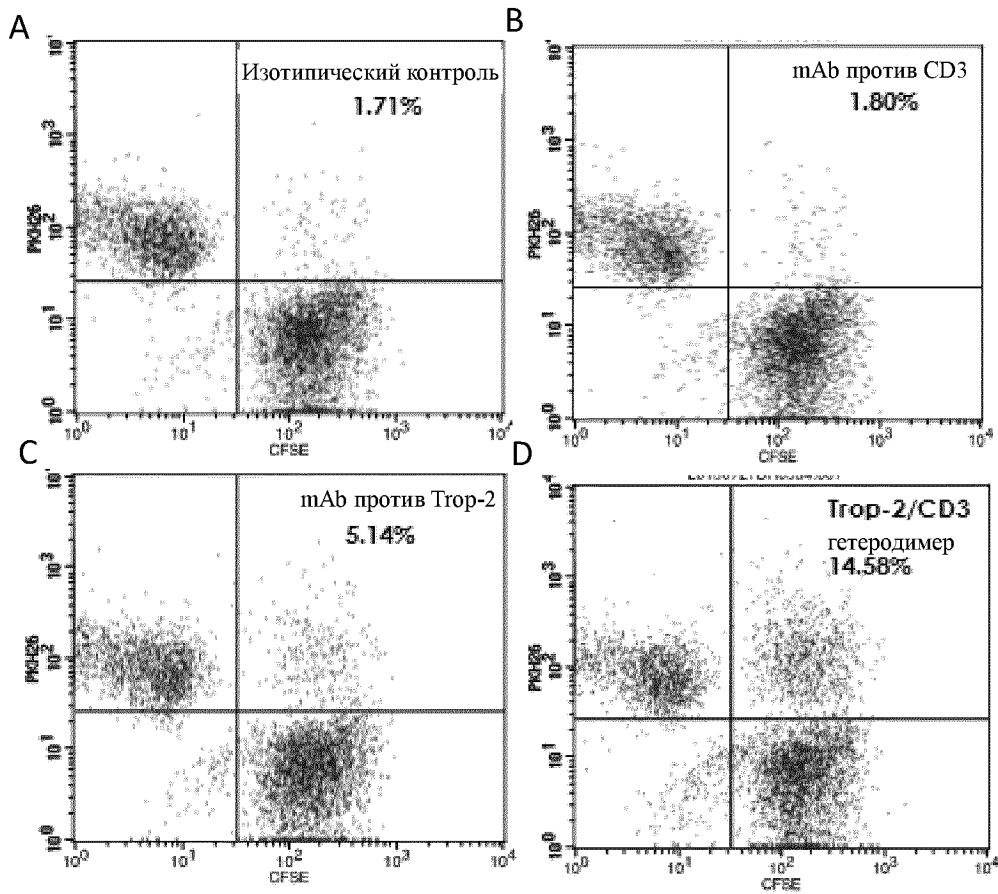
1. Стандарт молекулярной массы
2. Очищенное гетеродимерное антитело

1 2

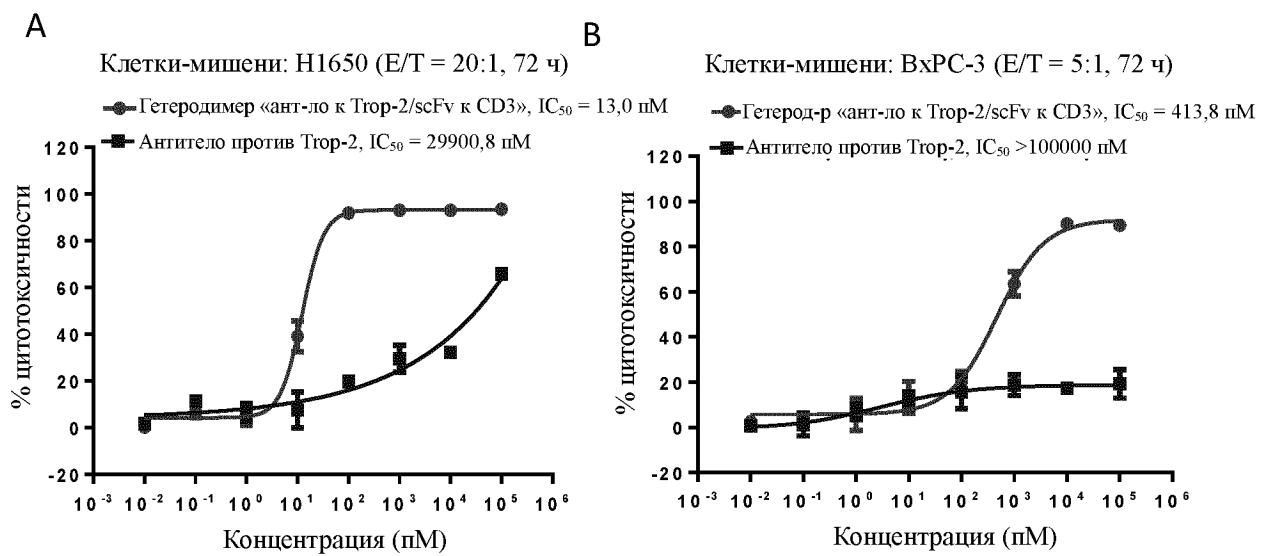
Фиг. 14



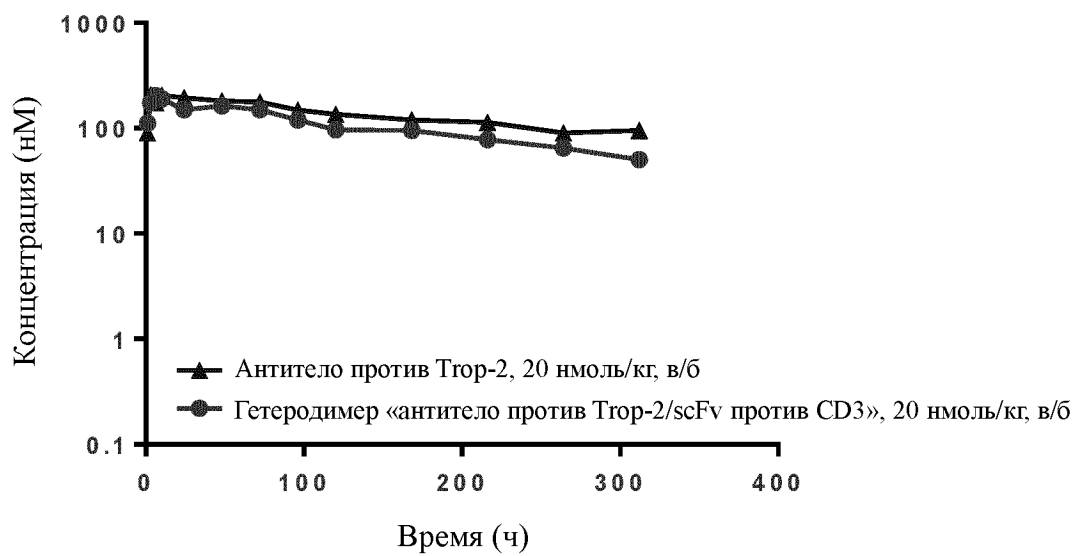
Фиг. 15



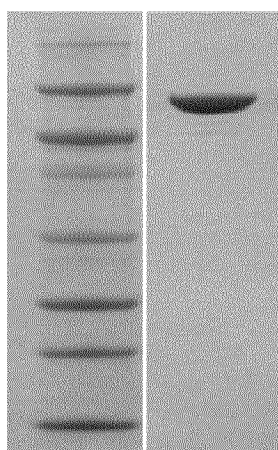
Фиг. 16



Фиг. 17



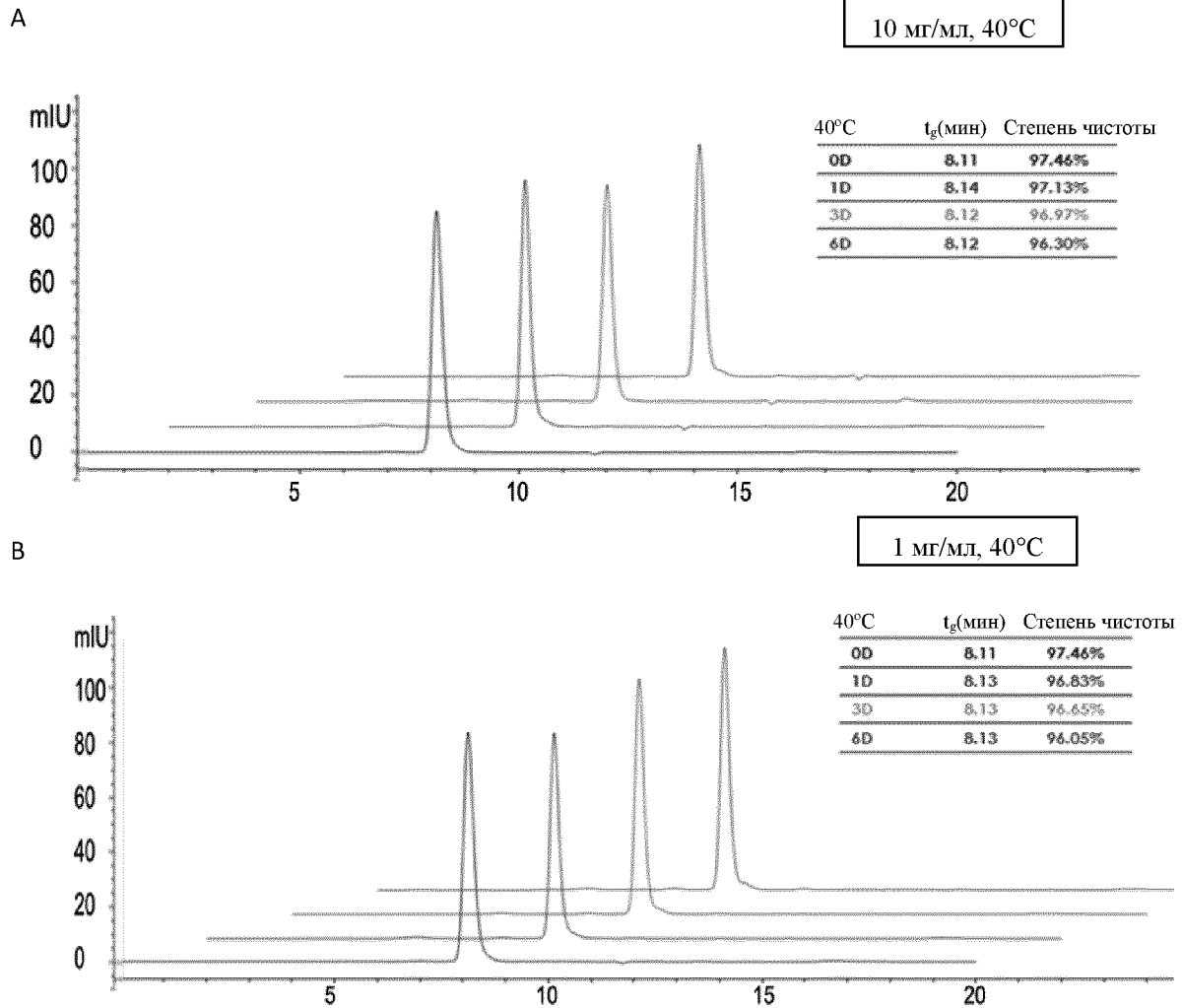
Фиг. 18



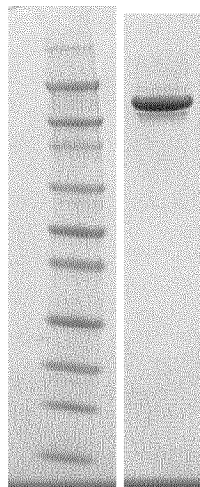
1 2

1. Стандарт молекулярной массы
2. Очищенное гетеродимерное антитело

Фиг. 19



Фиг. 20

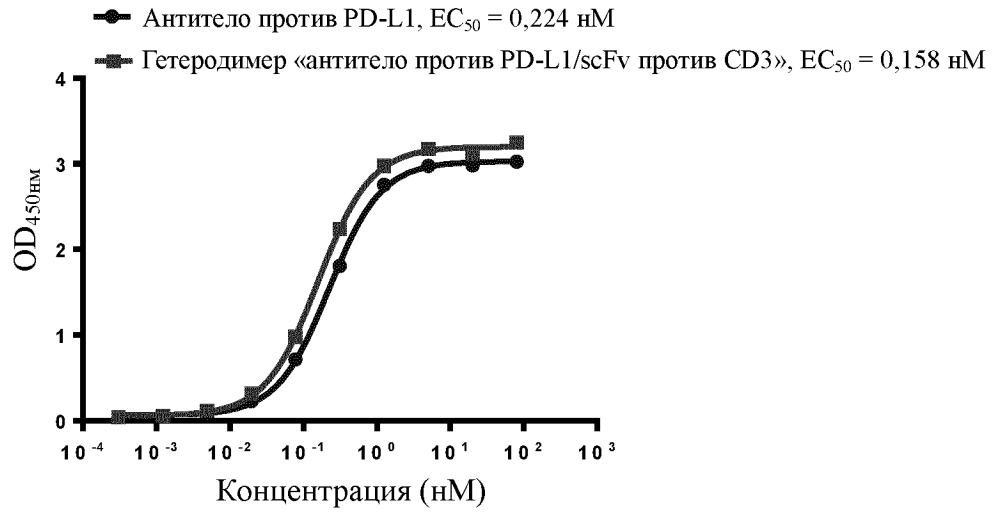


1

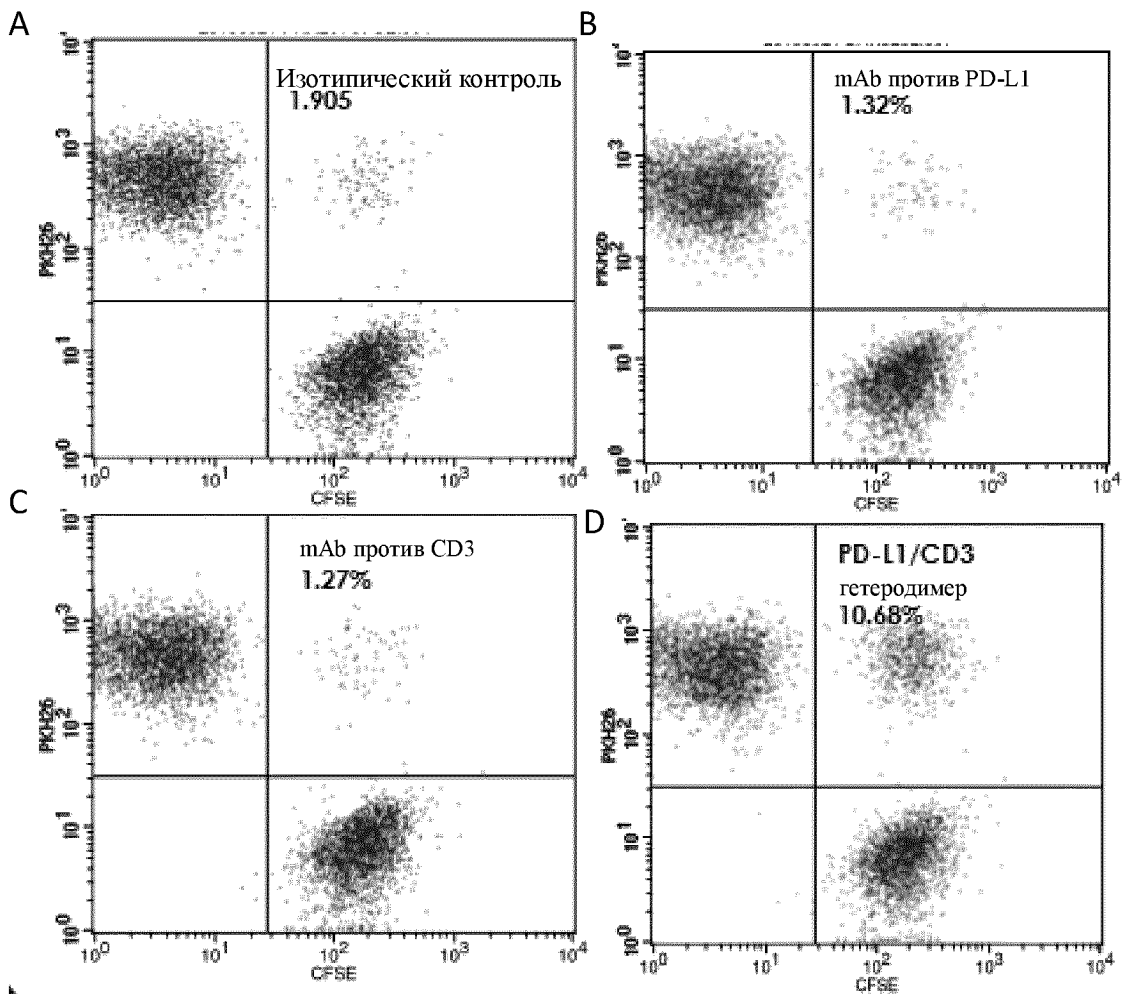
2

1. Стандарт молекулярной массы
2. Очищенное гетеродимерное антитело

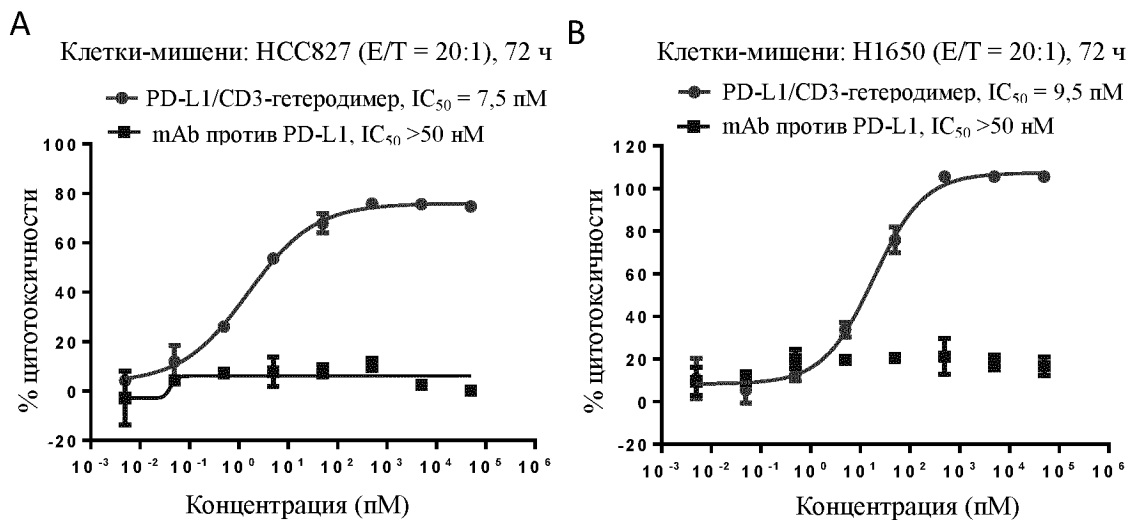
Фиг. 21



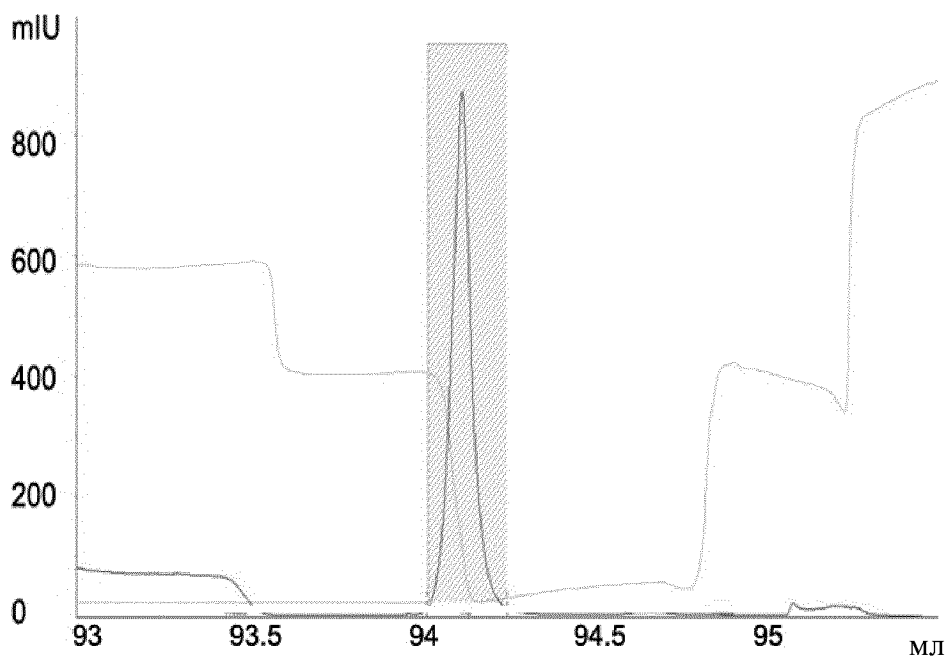
Фиг. 22



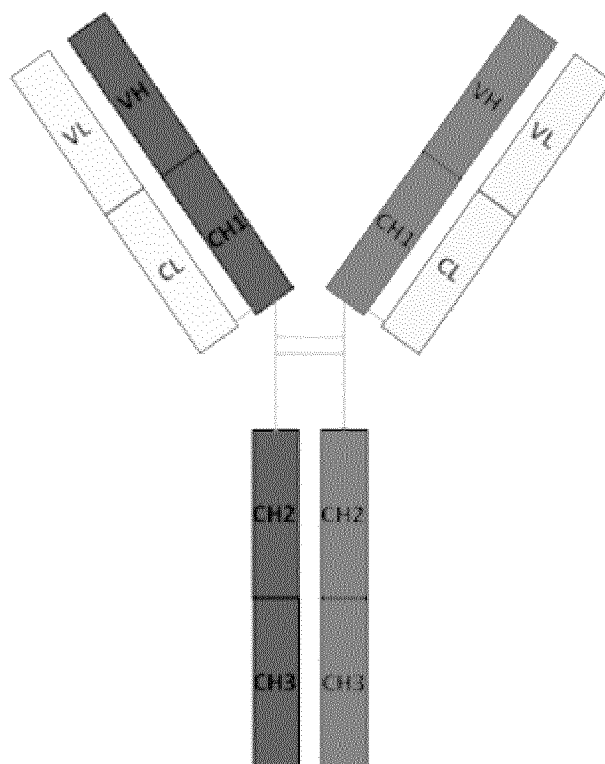
Фиг. 23



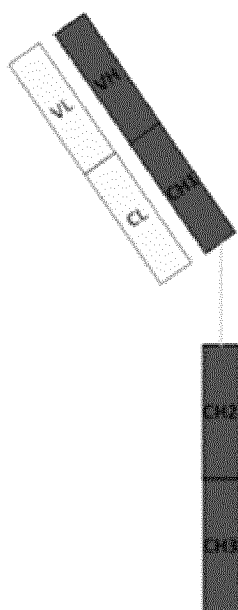
Фиг. 24



Фиг. 25

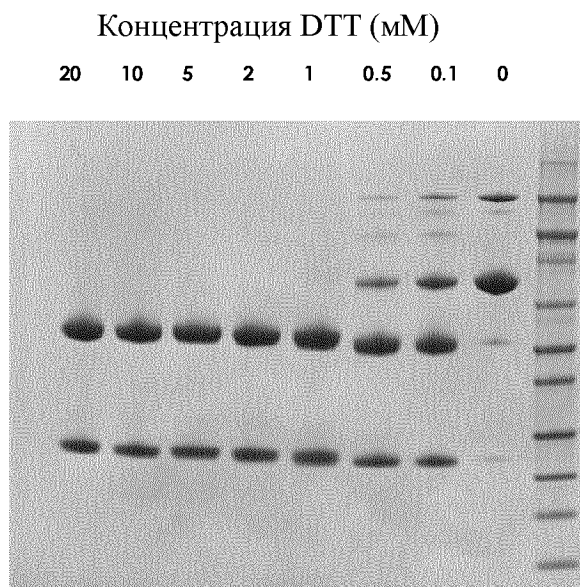


Фиг. 26

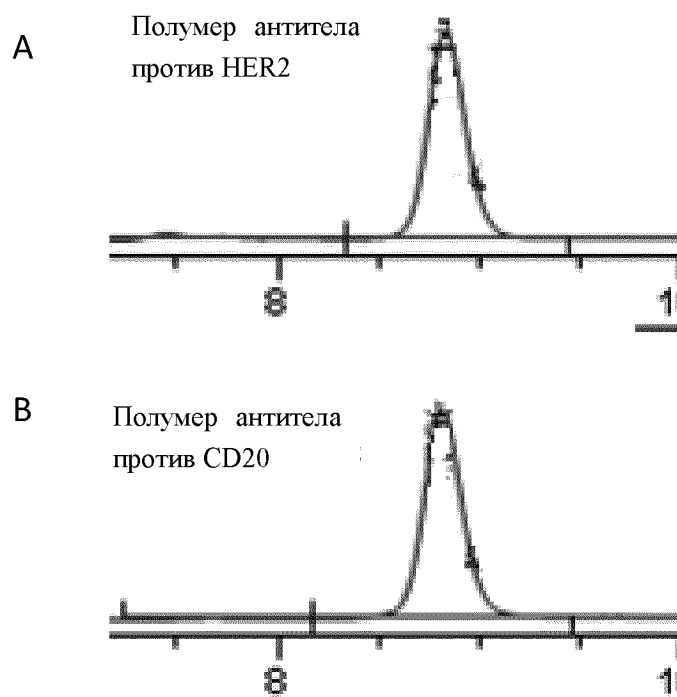


ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ

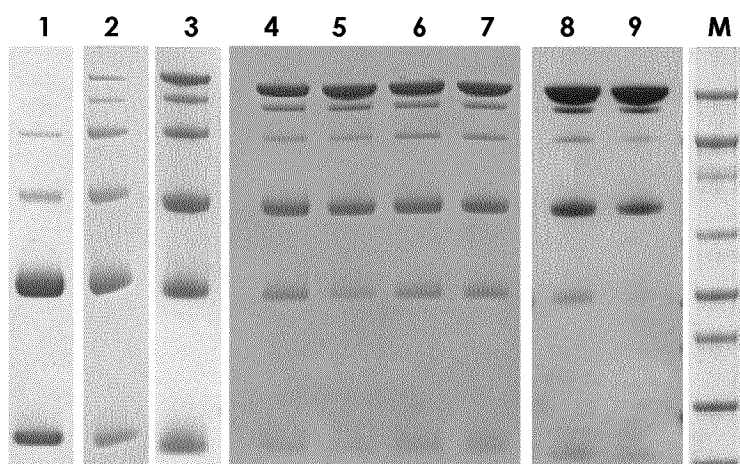
Фиг. 27



Фиг. 28

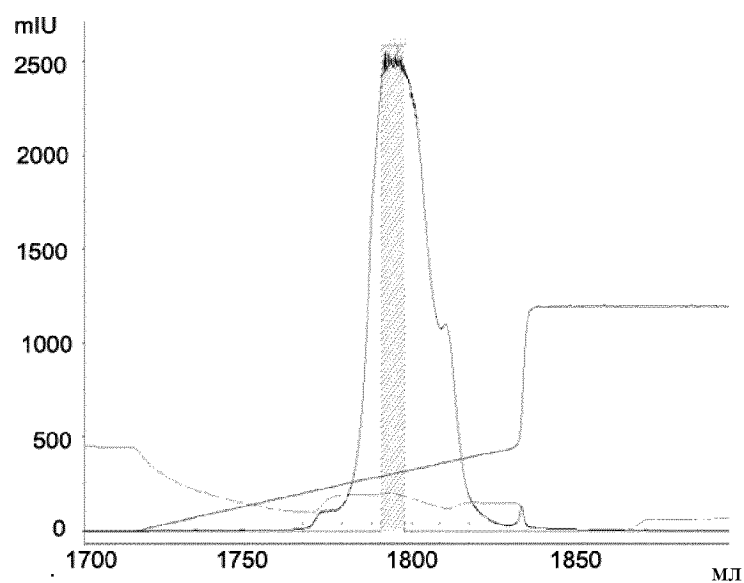


Фиг. 29



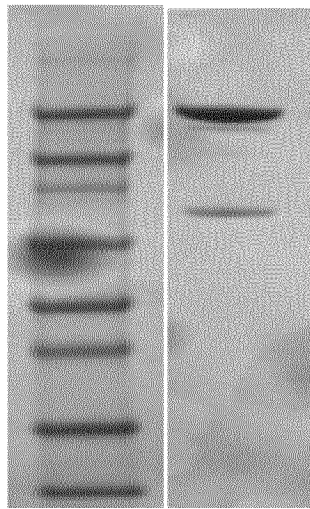
1. Воздух, 1 сутки
2. Воздух, 3 сутки
3. Воздух, 5 сутки
4. (L)- dHAA, 0,5 мМ
5. (L)- dHAA, 1 мМ
6. (L)- dHAA, 5 мМ
7. (L)- dHAA, 10 мМ
8. (L)- dHAA, 5 мМ, 5 ч
9. (L)- dHAA, 5 мМ, 24 ч

Фиг. 30



ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ

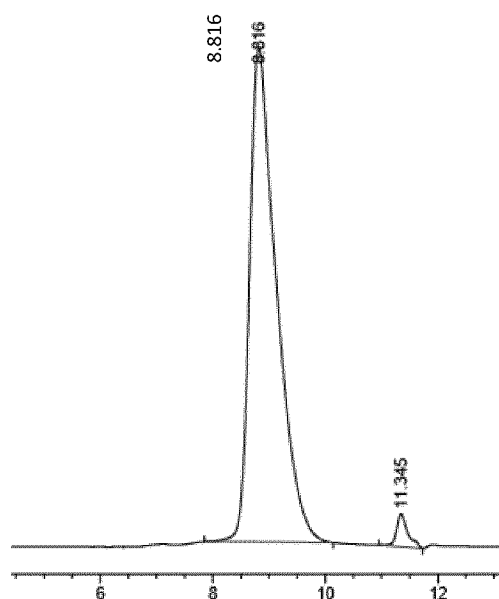
Фиг. 31



1. Стандарт молекулярной массы
2. Очищенное гетеродимерное антитело

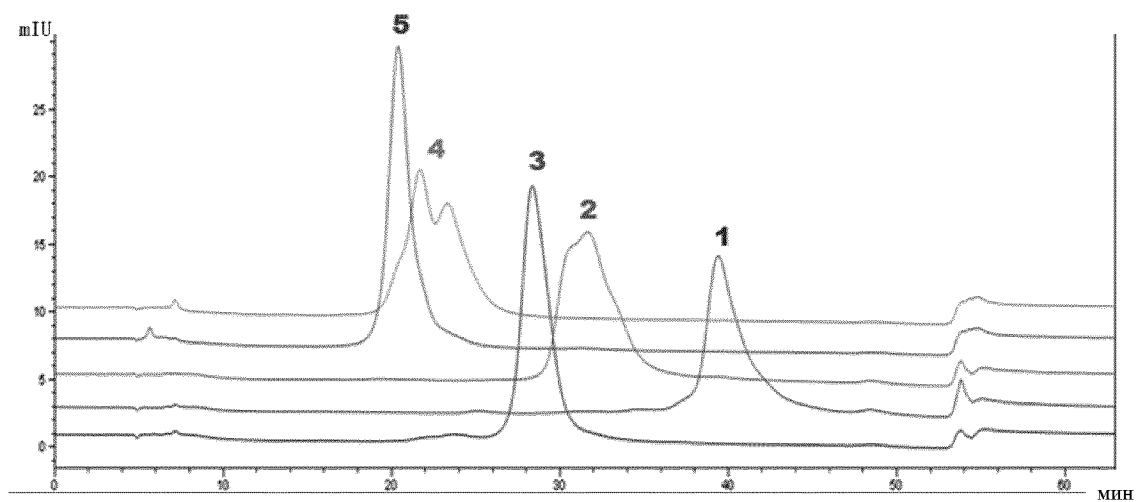
1**2**

Фиг. 32

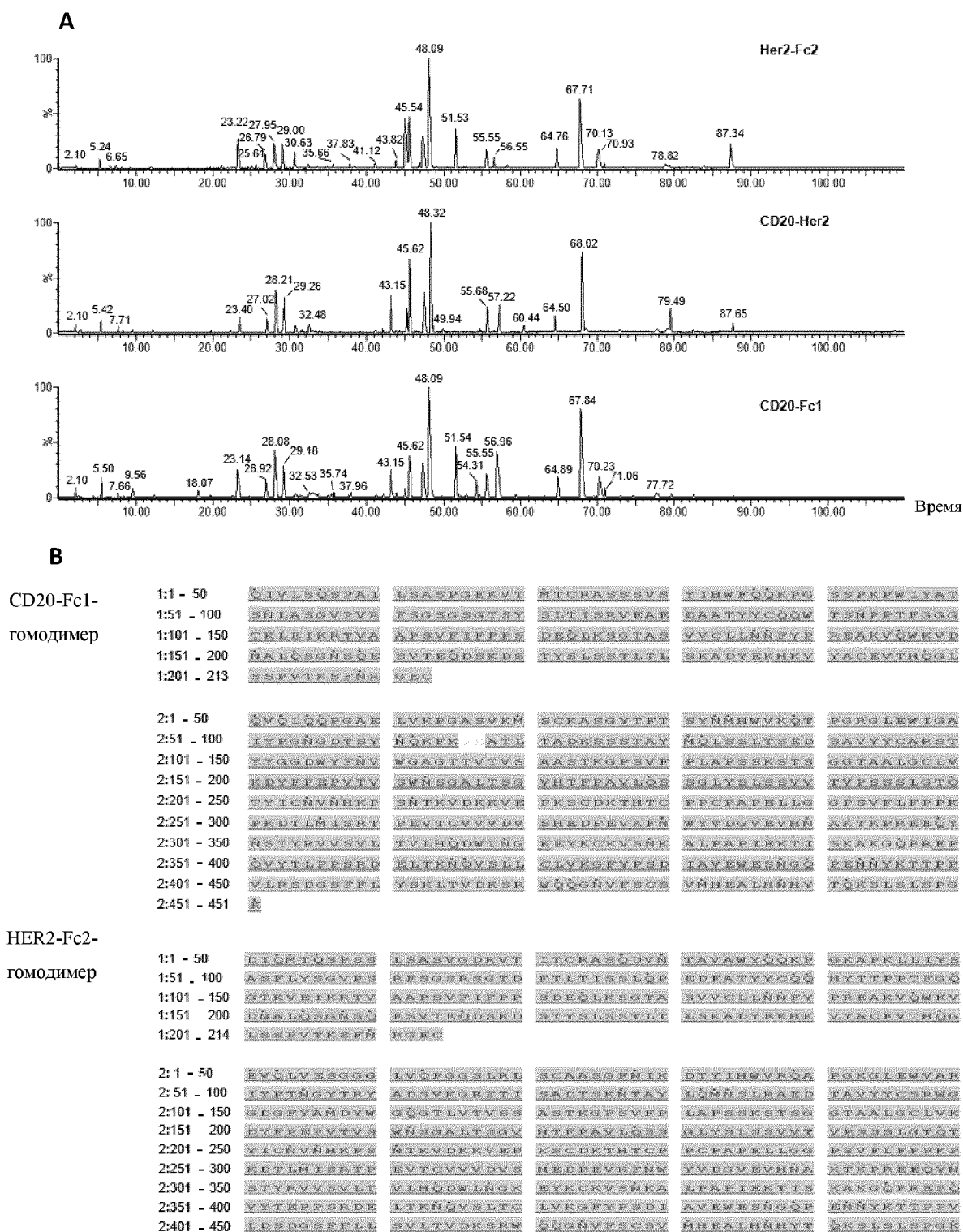


Фиг. 33

1. CD20-Fc1, гомодимер
2. CD20-Fc1, мономер
3. CD20-Fc1+Her2-Fc2, образец после обратного окисления
4. Мономер Her2-Fc2
5. Гомодимер Her2-Fc2



Фиг. 34А и 34В



Фиг. 34В (продолжение)

CD20-HER2- гетеродимер	1: 1 - 50	QIVLSQSPAF	LSASFRKVT	MTCRASSEVE	YIHWFQQKPS	SSPKWIIYAT
	1: 51 - 100	SNLASGVFVF	PSGGSGTSTY	SLTISRVDAB	DAATYYCQQW	TSNPFTEGGG
	1:101 - 150	TKLEIKRTVA	APSVFIFFEF	DEQLKSGTAS	VVCLLNHFYF	REAKVQWKVD
	1:151 - 200	NALQSGNSQF	SVTEQDSKDE	TYSLESTLTI	SKADYEKKKV	YACEVTHGGD
	1:201 - 213	SSPVTKSPNR	REC			
	2: 1 - 50	QVQLQOPGAE	LVRFGASVKM	SCKASGYTFT	SYNMHWVKQT	PSRGLRWISA
	2: 51 - 100	IYPGNQDTSY	NQRFK : ATL	TADKSSSTAY	MLLSLTSSEI	SAVYYCARST
	2:101 - 150	YYGGDWYFNV	WGAGTIVTVE	AASTKGFSVE	ELAPESKETS	GSTAALGCLV
	2:151 - 200	KQYFPEPVTV	SNNSGALTSI	VHTFPAVLQS	GLYSLSSVY	YVSSSLGTQ
	2:201 - 250	TVICNVNHRK	NTKVDK : VE	PKSCDKTHTC	PCPAPPELLG	PSVFLFPFK
2:251 - 300	PKDTLMISRT	PEVTCVVYDV	SHEDPEVKEN	WYVDGVEVHN	AKTKPREEQY	
2:301 - 350	NSTYRVYSVL	TVLHQDWLNG	KEYKCKVSNK	ALPAPIERTI	SKANGQPREP	
2:351 - 400	QVYTLPPSRD	ELTKNQVELL	CLVKGFPYSD	IAPWESNGQ	PENNYKTTTP	
2:401 - 450	VLRSDGSPFL	YSKLTVDKSN	WQGGNVFSCS	VMHEALHNHY	TQKSLSLSPG	
2:451 - 451	K					
	1: 1 - 50	RIQMTPSPRE	LSASVGRVVT	ITCRASQDVN	TAVAWYQKPE	GRAPKLLIYS
	1: 51 - 100	ASFLYSGVPE	PSGSRSGTD	FLTISSLQF	EDPATYYCQY	HYTTEFTGQ
	1:101 - 150	STRVEIKRTY	AAPSVFIFFE	SDEQLKSGTA	SVYCLLNHFY	REAKVQWKVD
	1:151 - 200	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYSLESTLT	LSKADYERKH	YACEVTHGG
	1:201 - 214	LSSPVTKSPNR	RREC			
	2: 1 - 50	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFNIK	DTYIHWVRSQ	PSKGLEWVAR
	2: 51 - 100	IYETNGYTRY	ADSVKQRETI	SADTSKNTAY	LQNNSLRAED	TAVYYCSEWS
	2:101 - 150	GDGFYAMDYW	GGSTLVVSS	ASTKGFSVFP	LAPESKETS	GTAALGCLVK
	2:151 - 200	RYFPEPVTVS	WNSGALTSQV	HTFPAVLQSS	GLYSLSSVYT	YVSSSLGTQT
	2:201 - 250	YICNVNHRKPE	NTKVDK : VEE	KSCDKTHTCP	PCPAPPELLG	PSVFLFPFK
2:251 - 300	KDTLMISRTPE	PEVTCVVYDV	HEDEPEVKEN	YVDGVEVHNA	AKTKPREEQYN	
2:301 - 350	STYRVYSVLT	VLRHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIERTIS	KANGQPREP	
2:351 - 400	VYTEPPSRDE	ELTKNQVELL	CLVKGFPYSDI	AVRWESNGQY	PENNYKTTTPV	
2:401 - 450	LRSDGSPFLI	YSKLTVDKSN	WQGGNVFSCSV	MHEALHNHYT	TQKSLSLSPGK	