

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202193322 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.03.10(51) Int. Cl. C07K 16/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2020.05.29(54) КОНСТРУИРОВАНИЕ ШАРНИРНОЙ ОБЛАСТИ ДЛЯ УПРАВЛЕНИЯ
ДИМЕРИЗАЦИЕЙ АНТИТЕЛ

(31) 62/854,907

(32) 2019.05.30

(33) US

(86) PCT/US2020/035196

(87) WO 2020/243477 2020.12.03

(88) 2021.01.07

(71) Заявитель:

ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

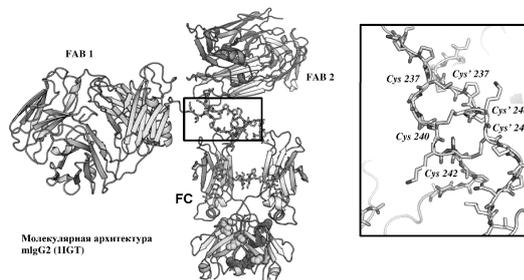
Гарсес Фернандо, Ван Чжулунь (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Клинический потенциал полиспецифических антител, таких как биспецифические и триспецифические антитела, демонстрирует большие перспективы для нацеливания на сложные заболевания. Однако создание данных молекул ставит очень сложные задачи, поскольку во многих случаях требуется специфически управлять специфическим образованием пар из нескольких полипептидных цепей, которые присутствуют в растворах. В случае тяжелых цепей существуют две основные области, которые образуют поверхность димера. Одной из них является область СН3, которую широко использовали посредством либо вставки мутаций с заменой пар заряженных аминокислот (СРМ) для направления поверхности димера, либо вставки крупных объемных остатков в полость (выступ в углубление), чтобы физически способствовать или препятствовать образованию димера. Однако не каждую из этих стратегий можно применять к каждой молекуле, и поэтому существует потребность в дополнительных инструментах. В данном документе авторы настоящего изобретения описывают конструирование шарнирной области с небольшим количеством мутаций, которые способны по отдельности успешно управлять димеризацией тяжелых цепей.

НАЦЕЛИВАНИЕ НА ШАРНИРНУЮ ОБЛАСТЬ С ОБРАЗОВАНИЕМ ГЕТЕРОДИМЕРОВ



A1

202193322

202193322

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-572038EA/032

КОНСТРУИРОВАНИЕ ШАРНИРНОЙ ОБЛАСТИ ДЛЯ УПРАВЛЕНИЯ ДИМЕРИЗАЦИЕЙ АНТИТЕЛ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[1] Настоящее изобретение относится к области биофармацевтических препаратов. В частности, настоящее изобретение относится к полиспецифическим антигенсвязывающим белкам, которые способны специфически связываться с по меньшей мере двумя целевыми антигенами. Полиспецифические антигенсвязывающие белки содержат две отдельные тяжелые цепи в шарнирной области, в которых использованы мутации с заменой пар заряженных аминокислот для того, чтобы они обе способствовали образованию гетеродимера при подавлении образования гомодимера.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[2] Антитела стали предпочтительной формой в биофармацевтической промышленности, поскольку они обладают несколькими характеристиками, которые привлекательны для специалистов, разрабатывающих терапевтические молекулы. Наряду со способностью к нацеливанию на конкретные структуры или клетки, антитела делают свою мишень восприимчивой к фагоцитозу, опосредованному клетками с Fc-рецепторами, и уничтожению (Raghavan and Bjorkman 1996). Кроме того, способность антитела взаимодействовать с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) pH-зависимым образом придает ему увеличенный период полужизни в сыворотке крови (Ghetie and Ward 2000). Данный уникальный признак антител позволяет продлить период полужизни терапевтического белка или пептида в сыворотке крови посредством конструирования молекул, слитых с Fc.

[3] В определенных случаях требуется создать молекулу, которая содержит Fc-часть антитела, но является гетеродимером. Важной областью применения гетеродимерных молекул с Fc является получение полиспецифических антител, например биспецифического антитела. Биспецифические антитела относятся к антителам, характеризующимся специфичностью в отношении по меньшей мере двух различных антигенов (Nolan and O'Kennedy 1990; de Leij, Molema et al. 1998; Carter 2001). Вместо того, чтобы иметь идентичную последовательность в обоих Fab, биспецифические антитела несут различные последовательности в двух Fab таким образом, что каждое плечо Y-образной молекулы способно связываться с различными антигенами. Другой областью применения гетеродимеров с Fc является добавление к терапевтической молекуле фрагмента, увеличивающего период полужизни. В таких случаях одна или обе из двух различных Fc-частей могут быть слиты с одной или несколькими терапевтическими молекулами, нуждающимися в увеличении периода полужизни.

[4] Классический способ получения гетеродимеров с Fc был разработан Carter и коллегами, когда они сконструировали тяжелые цепи для гетеродимеризации с применением стратегии "выступы-в углубления" (Ridgway, Presta et al. 1996; Atwell, Ridgway et al. 1997; Merchant, Zhu et al. 1998; Carter 2001). Концепция "выступы-в

углубления" была первоначально предложена Crick в качестве модели упаковки боковых цепей аминокислот между соседними α -спиралями (Crick 1952). Carter и коллеги создали выступ на поверхности взаимодействия домена СНЗ первой цепи посредством замены меньшей боковой цепи аминокислоты на большую (например Т366У), и углубление в совмещенном положении на поверхности взаимодействия СНЗ второй цепи создали посредством замены большей боковой цепи аминокислоты на меньшую (например У407Т). Основание для создания выступа и углубления в совмещенных положениях заключается в том, что взаимодействие выступа и углубления будет способствовать образованию гетеродимера, тогда как взаимодействие выступ-выступ и углубление-углубление будет препятствовать образованию гомодимеров вследствие стерического столкновения и исключения благоприятных взаимодействий соответственно. Мутации типа выступы-в-углубления также сочетали с конструированием дисульфидной связи между доменами СНЗ для усиления образования гетеродимеров (Sowdhamini, Srinivasan et al. 1989; Atwell, Ridgway et al. 1997). В дополнение к данным мутациям также варьировали соотношение введенной ДНК для максимизации выхода (Merchant, Zhu et al. 1998). Методика "выступы-в-углубления" раскрыта в патентах США № 5731168 и № 7183076.

[5] Клинический потенциал полиспецифических антител (молекул, которые нацеливаются на несколько мишеней одновременно), таких как биспецифические и триспецифические антитела, а также терапевтических белков с увеличенным периодом полужизни демонстрирует большую перспективу для нацеливания на сложные заболевания. Однако создание данных молекул ставит очень сложные задачи, поскольку во многих случаях желательно специфически управлять образованием пар из нескольких полипептидных цепей, которые присутствуют в растворах. В данном документе авторы настоящего изобретения описывают конструирование шарнирной области с небольшим количеством мутаций, которые способны по отдельности успешно управлять димеризацией Fc.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[6] В одном аспекте настоящее изобретение направлено на выделенный гетеромультимер, содержащий шарнирный домен гетеродимерного иммуноглобулина, содержащий первый полипептид шарнирного домена иммуноглобулина и второй полипептид шарнирного домена иммуноглобулина, где:

[7] (i) первый полипептид шарнирного домена иммуноглобулина содержит следующие аминокислотные замены: P243K, A244K, P245K, N/E246K и L247K, и

[8] (ii) второй полипептид шарнирного домена иммуноглобулина содержит следующие аминокислотные замены: P243D, A244D, P245D, N/E246D и L247D;

[9] где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, изложенному согласно Kabat.

[10] В другом аспекте настоящее изобретение направлено на выделенный гетеромультимер, содержащий шарнирный домен гетеродимерного иммуноглобулина, содержащий первый полипептид шарнирного домена иммуноглобулина и второй

полипептид шарнирного домена иммуноглобулина, где:

[11] (i) первый полипептид шарнирного домена иммуноглобулина содержит следующую аминокислотную замену: A244H, и

[12] (ii) второй полипептид шарнирного домена иммуноглобулина содержит следующие аминокислотные замены: N/E246D и L247D;

[13] где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, изложенному согласно Kabat.

[14] В другом аспекте настоящее изобретение направлено на выделенный гетеромультимер, содержащий шарнирный домен гетеродимерного иммуноглобулина, содержащий первый полипептид шарнирного домена иммуноглобулина и второй полипептид шарнирного домена иммуноглобулина, где:

[15] (i) первый полипептид шарнирного домена иммуноглобулина содержит следующие аминокислотные замены: H237K, T238K, A244K и N/E246K, и

[16] (ii) второй полипептид шарнирного домена иммуноглобулина содержит следующие аминокислотные замены: H237D, T238D, A244D и N/E246D;

[17] где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, изложенному согласно Kabat.

[18] В определенных вариантах осуществления каждый полипептид шарнирного домена гетеромультимера дополнительно содержит замену L248C.

[19] В определенных вариантах осуществления каждый полипептид шарнирного домена иммуноглобулина дополнительно содержит домен СН3. В одном варианте осуществления один домен СН3 содержит мутацию F405L, F405A, F405D, F405E, F405H, F405I, F405K, F405M, F405N, F405Q, F405S, F405T, F405V, F405W или F405Y, а другой домен СН3 содержит мутацию K409R; где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, изложенному согласно Kabat. В одном варианте осуществления один домен СН3 содержит мутацию T366W, а другой домен СН3 содержит мутации T366S, L368A, Y407V; где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, изложенному согласно Kabat. В одном варианте осуществления один домен СН3 содержит мутации K/R409D и K392D, а другой домен СН3 содержит мутации D399K и E356K; где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, изложенному согласно Kabat. В одном варианте осуществления один домен СН3 содержит мутацию Y349C, а другой домен СН3 содержит мутацию E356C или S354C; где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, изложенному согласно Kabat. В одном варианте осуществления один домен СН3 содержит мутации Y349C и T366W, а другой домен СН3 содержит мутации E356C, T366S, L368A и Y407V; где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, изложенному согласно Kabat. В одном варианте осуществления один домен СН3 содержит мутации Y349C и T366W, а другой домен СН3 содержит мутации S354C, T366S, L368A, Y407V; где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, изложенному согласно Kabat.

[20] В определенных вариантах осуществления шарнирная область иммуноглобулина представляет собой шарнирную область IgG1.

[21] В определенных вариантах осуществления гетеромультимер представляет собой биспецифическое или полиспецифическое антитело.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[22] На ФИГ. 1 изображено нацеливание на шарнирную область с образованием гетеродимеров.

[23] На ФИГ. 2 изображена кристаллическая структура человеческого IgG1, где не показана вторая дисульфидная связь в СРРС, хотя это может быть артефактом, вызванным радиационным повреждением в ходе сбора рентгеновских данных. Также кристаллическая структура мышинового IgG1 (1IGY), а также данные масс-спектрометрии, проведенной в лаборатории, убедительно свидетельствуют о том, что дисульфид C242 должен быть интактным. Следовательно, использование структур mIgG1 и huIgG2 в качестве основного ориентира приводит к лучшему пониманию положений ротамеров остатков ниже мотива СРРС.

[24] На ФИГ. 3 изображены результаты выравнивания последовательностей IgG1, IgG2 и IgG4.

[25] На ФИГ. 4 изображена сводная таблица шарнирных конструкций и оценки контроля качества (MSQC).

[26] На ФИГ. 5 изображена конструкция шарнира CZN01 с заряженной застежкой-молнией. Согласно кристаллической структуре C239 является единственным C, образующим дисульфидный мостик в пределах шарнира IgG1 (Saphire & Wilson, Science, 2001 (антитело B12 к HIV-1). Однако другие данные свидетельствуют о том, что второй Cys (C242) все еще способен образовывать дисульфидную связь, а также о том, что P241, по-видимому, важен для возникновения той же самой связи. Тогда рациональной является разработка цепи СРМ, лежащей ниже данного второго дисульфида (см. мутации, обозначенные оранжевой линией), с последующей вставкой нового дисульфида в L248C (обозначено оранжевой пунктирной линией).

[27] На ФИГ. 6 изображены результаты аналитической СЕХ и масс-спектрометрии CZN01.

[28] На ФИГ. 7 изображена конструкция шарнира CZN09 с заряженной застежкой-молнией.

[29] На ФИГ. 8 изображены результаты аналитической СЕХ и масс-спектрометрии CZN09.

[30] На ФИГ. 9 изображено структурное руководство по получению шарнира с заряженной застежкой-молнией в IgG2.

[31] На ФИГ. 10 изображены результаты аналитической СЕХ и масс-спектрометрии CZN11.

[32] На ФИГ. 11 изображено нацеливание на шарнирную область с образованием гетеродимеров+СРМ в СН3 v11.

[33] На ФИГ. 12 изображена сводная таблица шарнирных конструкций+СНЗ-СНЗ' СРМ v11.

[34] На ФИГ. 13 изображены результаты анализа термостабильности шарнирных конструкций. Мутации в шарнире не оказывают отрицательного влияния на стабильность Ab, а мутации СРМ в СНЗ v11, по-видимому, снижают Tm на +/- 2 градуса.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[35] В одном аспекте настоящее изобретение направлено на выделенный гетеромультимер, содержащий шарнирный домен гетеродимерного иммуноглобулина, содержащий первый полипептид шарнирного домена иммуноглобулина и второй полипептид шарнирного домена иммуноглобулина, где:

[36] (i) первый полипептид шарнирного домена иммуноглобулина содержит следующие аминокислотные замены: P243K, A244K, P245K, N/E246K и L247K, и

[37] (ii) второй полипептид шарнирного домена иммуноглобулина содержит следующие аминокислотные замены: P243D, A244D, P245D, N/E246D и L247D;

[38] где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, изложенному согласно Kabat.

[39] В другом аспекте настоящее изобретение направлено на выделенный гетеромультимер, содержащий шарнирный домен гетеродимерного иммуноглобулина, содержащий первый полипептид шарнирного домена иммуноглобулина и второй полипептид шарнирного домена иммуноглобулина, где:

[40] (i) первый полипептид шарнирного домена иммуноглобулина содержит следующую аминокислотную замену: A244H, и

[41] (ii) второй полипептид шарнирного домена иммуноглобулина содержит следующие аминокислотные замены: N/E246D и L247D;

[42] где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, изложенному согласно Kabat.

[43] В другом аспекте настоящее изобретение направлено на выделенный гетеромультимер, содержащий шарнирный домен гетеродимерного иммуноглобулина, содержащий первый полипептид шарнирного домена иммуноглобулина и второй полипептид шарнирного домена иммуноглобулина, где:

[44] (i) первый полипептид шарнирного домена иммуноглобулина содержит следующие аминокислотные замены: H237K, T238K, A244K и N/E246K, и

[45] (ii) второй полипептид шарнирного домена иммуноглобулина содержит следующие аминокислотные замены: H237D, T238D, A244D и N/E246D;

[46] где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, изложенному согласно Kabat.

[47] В определенных вариантах осуществления каждый полипептид шарнирного домена гетеромультимера дополнительно содержит замену L248C.

[48] В определенных вариантах осуществления каждый полипептид шарнирного домена иммуноглобулина дополнительно содержит домен СНЗ. В одном варианте

осуществления один домен СНЗ содержит мутацию F405L, F405A, F405D, F405E, F405H, F405I, F405K, F405M, F405N, F405Q, F405S, F405T, F405V, F405W или F405Y, а другой домен СНЗ содержит мутацию K409R; где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, изложенному согласно Kabat. В одном варианте осуществления один домен СНЗ содержит мутацию T366W, а другой домен СНЗ содержит мутации T366S, L368A, Y407V; где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, изложенному согласно Kabat. В одном варианте осуществления один домен СНЗ содержит мутации K/R409D и K370E, а другой домен СНЗ содержит мутации D399K и E357K; где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, изложенному согласно Kabat.

[49] В конкретных вариантах осуществления гетеродимерное антитело содержит первую тяжелую цепь, содержащую отрицательно заряженные аминокислоты в положениях 392 и 409 (например замены K392D и K409D), и вторую тяжелую цепь, содержащую положительно заряженные аминокислоты в положениях 356 и 399 (например замены E356K и D399K). В других конкретных вариантах осуществления гетеродимерное антитело содержит первую тяжелую цепь, содержащую отрицательно заряженные аминокислоты в положениях 392, 409 и 370 (например замены K392D, K409D и K370D), и вторую тяжелую цепь, содержащую положительно заряженные аминокислоты в положениях 356, 399 и 357 (например замены E356K, D399K и E357K). В связанных вариантах осуществления первая тяжелая цепь происходит от антитела к рецептору CGRP, а вторая тяжелая цепь происходит от антитела к рецептору PAC1. В других связанных вариантах осуществления первая тяжелая цепь происходит от антитела к рецептору PAC1, а вторая тяжелая цепь происходит от антитела к рецептору CGRP.

[50] В одном варианте осуществления один домен СНЗ содержит мутацию Y349C, а другой домен СНЗ содержит мутацию E356C или S354C; где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, изложенному согласно Kabat. В одном варианте осуществления один домен СНЗ содержит мутации Y349C и T366W, а другой домен СНЗ содержит мутации E356C, T366S, L368A и Y407V; где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, изложенному согласно Kabat. В одном варианте осуществления один домен СНЗ содержит мутации Y349C и T366W, а другой домен СНЗ содержит мутации S354C, T366S, L368A, Y407V; где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, изложенному согласно Kabat.

[51] В определенных вариантах осуществления шарнирная область иммуноглобулина представляет собой шарнирную область IgG1.

[52] В определенных вариантах осуществления гетеромультимер представляет собой биспецифическое или полиспецифическое антитело.

[53] Используемый в данном документе термин "антигенсвязывающий белок" относится к белку, который специфически связывается с одним или несколькими целевыми антигенами. Антигенсвязывающий белок может включать антитело и его функциональные фрагменты. "Функциональный фрагмент антитела" представляет собой

часть антитела, в которой отсутствуют по меньшей мере некоторые аминокислоты, присутствующие в полноразмерной тяжелой цепи и/или легкой цепи, но которая все еще способна специфически связываться с антигеном. К функциональному фрагменту антитела относятся без ограничения Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, Fv-фрагмент, Fd-фрагмент и фрагмент определяющей комплементарности области (CDR), и они могут быть получены из любого источника, представляющего собой млекопитающее, такое как человек, мышь, крыса, кролик или представитель семейства верблюдовых. Функциональные фрагменты антител могут конкурировать за связывание целевого антигена с интактным антителом, и фрагменты могут быть получены посредством модификации интактных антител (например, посредством ферментативного или химического расщепления) или синтеза *de novo* с применением технологий рекомбинантной ДНК или синтеза пептидов.

[54] Антигенсвязывающий белок также может предусматривать белок, содержащий один или несколько функциональных фрагментов антитела, включенных в одну полипептидную цепь или в несколько полипептидных цепей. Например, антигенсвязывающие белки могут предусматривать без ограничения одноцепочечный Fv (scFv), диатело (см., например, EP 404097; WO 93/11161 и Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 90:6444-6448, 1993); интратело; доменное антитело (одиночный домен VL или VH или два или более доменов VH, соединенных посредством пептидного линкера; см. Ward et al., Nature, Vol. 341:544-546, 1989); макситело (2 scFv, слитых с Fc-областью, см. Fredericks et al., Protein Engineering, Design & Selection, Vol. 17:95-106, 2004 и Powers et al., Journal of Immunological Methods, Vol. 251:123-135, 2001); триатело; тетратело; минитело (scFv, слитый с доменом CH3; см. Olafsen et al., Protein Eng Des Sel., Vol.17:315-23, 2004); пептитело (один или несколько пептидов, присоединенных к Fc-области, см. WO 00/24782); линейное антитело (пара тандемных сегментов Fd (VH-CH1-VH-CH1), которые совместно с комплементарными полипептидами легких цепей образуют пару антигенсвязывающих областей, см. Zapata et al., Protein Eng., Vol. 8:1057-1062, 1995); небольшое модульное иммунофармацевтическое средство (см. публикацию патента США № 20030133939), и белки, слитые с иммуноглобулинами (например, IgG-scFv, IgG-Fab, 2scFv-IgG, 4scFv-IgG, VH-IgG, IgG-VH и Fab-scFv-Fc).

[55] "Полиспецифический" означает, что антигенсвязывающий белок способен специфически связываться с двумя или более различными антигенами. "Биспецифический" означает, что антигенсвязывающий белок способен специфически связываться с двумя различными антигенами. Как используется в данном документе, антигенсвязывающий белок "специфически связывается" с целевым антигеном в случае, если он характеризуется значительно более высокой аффинностью связывания, а следовательно способен отличать этот антиген, по сравнению с его аффинностью в отношении других неродственных белков в сходных условиях анализа связывания. Антигенсвязывающие белки, которые специфически связывают антиген, могут характеризоваться равновесной константой диссоциации (K_D), составляющей $\leq 1 \times 10^{-6}$ М.

Антигенсвязывающий белок специфически связывает антиген с "высокой аффинностью", если K_D составляет $\leq 1 \times 10^{-8}$ М.

[56] Аффинность определяют с применением различных методик, примером которых является анализ аффинности ELISA. В различных вариантах осуществления аффинность определяют с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса (например, анализ на основе Viascore®). С помощью данной методологии можно измерить константу скорости ассоциации (k_a в $M^{-1}c^{-1}$) и константу скорости диссоциации (k_d в c^{-1}). Равновесную константу диссоциации (K_D в М) можно затем рассчитать из отношения кинетических констант скорости (k_d/k_a). В некоторых вариантах осуществления аффинность определяют посредством кинетического способа, такого как анализ кинетического исключения (KinExA), как описано в Rathanaswami et al. *Analytical Biochemistry*, Vol. 373:52-60, 2008. С помощью анализа KinExA можно измерять равновесную константу диссоциации (K_D в М) и константу скорости ассоциации (k_a в $M^{-1}c^{-1}$). Константа скорости диссоциации (k_d в c^{-1}) может быть вычислена из этих значений ($K_D \times k_a$). В других вариантах осуществления аффинность определяется посредством способа с использованием равновесия/раствора. В определенных вариантах осуществления аффинность определяется посредством анализа связывания FACS.

[57] В некоторых вариантах осуществления биспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в данном документе, проявляют требуемые характеристики, такие как avidность связывания, измеренная с помощью k_d (константы скорости диссоциации), составляющей приблизительно 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} c^{-1} или ниже (более низкие значения указывают на более высокую avidность связывания), и/или аффинность связывания, измеренная с помощью K_D (равновесной константы диссоциации), составляющей приблизительно 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} , 10^{-14} , 10^{-15} , 10^{-16} М или ниже (более низкие значения указывают на более высокую аффинность связывания).

[58] Используемый в данном документе термин "антигенсвязывающий домен", который используется взаимозаменяемо со "связывающим доменом", относится к области антигенсвязывающего белка, которая содержит аминокислотные остатки, которые взаимодействуют с антигеном и придают антигенсвязывающему белку его специфичность и аффинность в отношении антигена.

[59] Используемый в данном документе термин "CDR" относится к определяющей комплементарность области (также называемой "минимальными единицами распознавания" или "гипервариабельной областью") в пределах вариабельных последовательностей антител. Существуют три CDR вариабельной области тяжелой цепи (CDRH1, CDRH2 и CDRH3) и три CDR вариабельной области легкой цепи (CDRL1, CDRL2 и CDRL3). Используемый в данном документе термин "CDR-область" относится к группе из трех CDR, которые встречаются в одной вариабельной области (т. е. три CDR легкой цепи или три CDR тяжелой цепи). CDR в каждой из двух цепей обычно выровнены по каркасным областям с образованием структуры, которая специфически связывается с

конкретным эпитопом или доменом на целевом белке. Как правило, от N-конца к С-концу встречающиеся в природе переменные области как легкой, так и тяжелой цепей соответствуют следующему порядку этих элементов: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Была разработана система нумерации для присвоения номеров аминокислотам, которые занимают положения в каждом из этих доменов. Данная система нумерации определена в *Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest* (1987 and 1991, NIH, Bethesda, Md) или Chothia & Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia et al., 1989, *Nature* 342:878-883. С помощью данной системы могут быть идентифицированы определяющие комплементарность области (CDR) и каркасные области (FR) данного антитела.

[60] В некоторых вариантах осуществления биспецифических антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению к связывающим доменам относятся Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) или нанотело. В одном варианте осуществления оба связывающих домена представляют собой Fab-фрагменты. В другом варианте осуществления один связывающий домен представляет собой Fab-фрагмент, а другой связывающий домен представляет собой scFv.

[61] Расщепление антител папаином приводит к получению двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов, называемых "Fab"-фрагментами, каждый с одним антигенсвязывающим сайтом, и остаточного "Fc"-фрагмента, который содержит константную область иммуноглобулина. Fab-фрагмент содержит весь переменный домен, а также константный домен легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи. Таким образом, "Fab-фрагмент" состоит из одной легкой цепи иммуноглобулина (переменной области (VL) и константной области (CL) легкой цепи) и области CH1 и переменной области (VH) одной тяжелой цепи иммуноглобулина. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидную связь с другой молекулой тяжелой цепи. Fc-фрагмент несет углеводы и отвечает за многие эффекторные функции антитела (такие как связывание комплемента и клеточных рецепторов), которые позволяют отличить один класс антител от другого. "Fd-фрагмент" содержит домены VH и CH1 из тяжелой цепи иммуноглобулина. Fd-фрагмент представляет собой компонент тяжелой цепи Fab-фрагмента.

[62] "Fab'-фрагмент" представляет собой Fab-фрагмент, содержащий на С-конце домена CH1 один или несколько остатков цистеина из шарнирной области антитела.

[63] "F(ab')₂-фрагмент" представляет собой бивалентный фрагмент, содержащий два Fab'-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком между тяжелыми цепями в шарнирной области.

[64] "Fv"-фрагмент представляет собой минимальный фрагмент, который содержит полный сайт распознавания и связывания антигена из антитела. Данный фрагмент состоит из димера одной переменной области тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина и одной переменной области легкой цепи (VL) иммуноглобулина в тесной нековалентной ассоциации. Именно в данной конфигурации три CDR каждой переменной области

взаимодействуют, определяя антигенсвязывающий сайт на поверхности димера VH-VL. Одна переменная область легкой цепи или тяжелой цепи (или половина Fv-фрагмента, содержащая только три CDR, специфических в отношении антигена) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с более низкой аффинностью, чем весь связывающий сайт, содержащий оба VH и VL.

[65] "Одноцепочечный переменный фрагмент антитела" или "scFv-фрагмент" содержит VH- и VL-области антитела, где данные области присутствуют в одной полипептидной цепи, и необязательно содержит пептидный линкер между VH- и VL-областями, что позволяет Fv образовывать структуру, требуемую для связывания антигена (см., например, Bird et al., *Science*, Vol. 242:423-426, 1988 и Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 85:5879-5883, 1988).

[66] "Нанотело" представляет собой переменную область тяжелой цепи из антитела с тяжелыми цепями. Такие переменные домены представляют собой наименьший полнофункциональный антигенсвязывающий фрагмент таких антител с тяжелыми цепями с молекулярной массой всего лишь 15 кДа. См. Cortez-Retamozo et al., *Cancer Research* 64:2853-57, 2004. Функциональные антитела с тяжелыми цепями, лишенные легких цепей, встречаются в природе у определенных видов животных, таких как акулы-няньки, ковровые акулы и представители семейства Camelidae, такие как верблюды, дромадеры, альпаки и ламы. У данных животных антигенсвязывающий сайт уменьшен до одного домена, домена V_HH. Данные антитела образуют антигенсвязывающие области с использованием только переменной области тяжелой цепи, т. е. данные функциональные антитела являются гомодимерами тяжелых цепей, имеющих только структуру H₂L₂ (называемые как "антитела с тяжелыми цепями" или "НСАб"). По сообщениям, камелизованный V_HH рекомбинирует с константными областями IgG2 и IgG3, которые содержат шарнир, домены CH2 и CH3 и не содержат домен CH1. Было обнаружено, что камелизованные домены V_HH связываются с антигеном с высокой аффинностью (Desmyter et al., *J. Biol. Chem.*, Vol. 276:26285-90, 2001) и обладают высокой стабильностью в растворе (Ewert et al., *Biochemistry*, Vol. 41:3628-36, 2002). Способы получения антител, содержащих камелизованные тяжелые цепи, описаны, например, в публикациях патентов США № 2005/0136049 и № 2005/0037421. Альтернативные остовы можно получить из человеческих доменов, подобных переменным, которые более точно соответствуют акульему остову V-NAR и могут служить каркасом для длинной проникающей петлевой структуры.

[67] В частности, в вариантах осуществления биспецифических антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению связывающие домены содержат переменную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина и переменную область легкой цепи (VL) иммуноглобулина из антитела или фрагмента антитела, которые специфически связываются с требуемым антигеном.

[68] Термин "переменная область", используемый в данном документе взаимозаменяемо с термином "переменный домен" (переменная область легкой цепи

(VL), вариабельная область тяжелой цепи (VH)), относится к области в каждой из легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина, которая непосредственно участвует в связывании антитела с антигеном. Как обсуждалось выше, области вариабельных областей легкой и тяжелой цепей имеют одинаковую общую структуру, и каждая область содержит четыре каркасные (FR) области, последовательности которых являются в значительной степени консервативными, соединенные тремя CDR. Каркасные области принимают конформацию бета-листа, и CDR могут образовывать петли, соединяющие структуру бета-листа. CDR в каждой цепи удерживаются в своей трехмерной структуре каркасными областями и вместе с CDR из другой цепи образуют сайт связывания антигена.

[69] Связывающие домены, которые специфически связываются с целевыми антигенами, можно получить а) из известных антител к этим антигенам или б) из новых антител или фрагментов антител, полученных посредством способов *de novo* иммунизации с применением антигенных белков или их фрагментов, посредством фагового дисплея или других стандартных способов. Антитела, из которых получены связывающие домены для биспецифических антигенсвязывающих белков, могут представлять собой моноклональные антитела, поликлональные антитела, рекомбинантные антитела, человеческие антитела или гуманизированные антитела. В определенных вариантах осуществления антитела, из которых получены связывающие домены, представляют собой моноклональные антитела. В этих и других вариантах осуществления антитела представляют собой человеческие антитела или гуманизированные антитела и могут относиться к типу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

[70] Термин "моноклональное антитело" (или "mAb"), как используется в данном документе, относится к антителу, полученному из популяции фактически гомогенных антител, например, отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными за исключением возможных, встречающихся в природе, мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими и направлены против отдельного антигенного сайта или эпитопа, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных эпитопов. Моноклональные антитела могут быть получены с применением любой методики, известной из уровня техники, например посредством иммортализации клеток селезенки, собранных от трансгенного животного после завершения схемы иммунизации. Клетки селезенки могут быть иммортализованы с применением любой методики, известной из уровня техники, например, путем их слияния с клетками миеломы для получения гибридом. Клетки миеломы для применения в процедурах слияния для получения гибридом предпочтительно представляют собой клетки, которые не продуцируют антитела, обладают высокой эффективностью слияния и характеризуются дефицитами ферментов, что делает их неспособными к росту в определенных селективных средах, которые поддерживают рост только требуемых слитых клеток (гибридом). Примеры подходящих линий клеток для применения в процедурах слияния с клетками мышей включают Sp-20,

P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 и S194/5XXO Bul; примеры линий клеток, используемых в процедурах слияния с клетками крыс, включают R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F и 4B210. Другими клеточными линиями, используемыми для гибридизации клеток, являются U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 и UC729-6.

[71] В некоторых случаях линию клеток гибридомы получают посредством иммунизации животного (например трансгенного животного, содержащего последовательности человеческого иммуноглобулина) с помощью целевого антигена; сбора клеток селезенки от иммунизированного животного; слияния собранных клеток селезенки с линией клеток миеломы с получением таким образом клеток гибридомы; получения линий клеток гибридомы из клеток гибридомы и идентификации линии клеток гибридомы, которая продуцирует антитело, которое связывает целевой антиген.

[72] Моноклональные антитела, секретируемые линией клеток гибридомы, могут быть очищены с применением любого способа, известного из уровня техники, такого как протеин А-сепарация, гидроксилапатитная хроматография, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография. Гибридомы или mAb можно дополнительно подвергнуть скринингу для идентификации mAb с конкретными свойствами, такими как способность связывать клетки, экспрессирующие целевой антиген, способность блокировать или препятствовать связыванию лиганда целевого антигена с его соответствующими рецепторами или способность функционально блокировать любой из данных рецепторов, например посредством анализа сАМР.

[73] В некоторых вариантах осуществления связывающие домены биспецифических антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению можно получить из гуманизированных антител. "Гуманизированное антитело" относится к антителу, в котором области (например каркасные области) были модифицированы таким образом, что они содержат соответствующие области из человеческого иммуноглобулина. Как правило, гуманизированное антитело можно получить из моноклонального антитела, изначально полученного в организме животного, отличного от человека. Некоторые аминокислотные остатки в этом моноклональном антителе, как правило, из участков антитела, которые не распознают антиген, модифицируют так, чтобы они были гомологичными соответствующим остаткам в антителе человека соответствующего изотипа. Гуманизацию можно осуществлять, например, с применением различных способов посредством замены по меньшей мере части варибельной области грызуна на соответствующие области человеческого антитела (см., например, патенты США № 5585089 и № 5693762; Jones et al., *Nature*, Vol. 321:522-525, 1986; Riechmann et al., *Nature*, Vol. 332:323-27, 1988; Verhoeven et al., *Science*, Vol. 239:1534-1536, 1988). CDR варибельных областей легкой и тяжелой цепей антител, полученных в организме другого вида, могут быть привиты на консенсусные человеческие FR. Для создания консенсусных FR человека FR из нескольких аминокислотных последовательностей тяжелой цепи или легкой цепей человека могут быть выровнены для идентификации консенсусной

аминокислотной последовательности.

[74] Новые антитела, выработанные против целевого антигена, из которых можно получить связывающие домены для биспецифических антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению, могут представлять собой полностью человеческие антитела. "Полностью человеческое антитело" представляет собой антитело, которое содержит переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов человека зародышевого типа или указывающие на них. Одним конкретным способом, предложенным для осуществления получения полностью человеческих антител, является "гуманизация" гуморальной иммунной системы мыши. Внесение иммуноглобулиновых локусов человека (Ig) в геном мышей, у которых были инактивированы эндогенные гены Ig, является одним из способов получения полностью человеческих моноклональных антител (mAb) в мыши - животном, которое можно иммунизировать любым требуемым антигеном. Применение полностью человеческих антител может минимизировать иммуногенные и аллергические реакции, которые иногда могут быть вызваны введением людям в качестве терапевтических средств из мыши или mAb, полученных из мыши.

[75] Полностью человеческие антитела могут быть получены посредством иммунизации трансгенных животных (обычно мышей), которые способны продуцировать репертуар антител человека в отсутствие продукции эндогенного иммуноглобулина. Применяемые для этой цели антигены, как правило, содержат шесть или больше смежных аминокислот и необязательно конъюгированы с носителем, таким как гаптен. См., например, Jakobovits et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551-2555; Jakobovits et al., 1993, Nature 362:255-258, и Bruggermann et al., 1993, Year in Immunol. 7:33. В одном примере такого способа трансгенных животных получают посредством инактивации эндогенных локусов мышинных иммуноглобулинов, кодирующих тяжелые и легкие цепи мышинных иммуноглобулинов, и вставки в геном мыши больших фрагментов геномной ДНК человека, содержащих локусы, которые кодируют человеческие белки тяжелых и легких цепей. Затем частично модифицированных животных, которые имеют неполный набор локусов человеческих иммуноглобулинов, подвергают кроссбридингу с получением животного, обладающего всеми требуемыми модификациями иммунной системы. В случае введения иммуногена эти трансгенные животные продуцируют антитела, которые являются иммуноспецифическими в отношении иммуногена, однако имеют скорее человеческие, а не мышинные аминокислотные последовательности, в том числе переменные области. Дополнительные подробности таких способов см., например, в WO96/33735 и WO94/02602. Дополнительные способы, относящиеся к применению трансгенных мышей для получения антител человека, описаны в патенте США № 5545807; № 6713610; № 6673986; № 6162963; № 5939598; № 5545807; № 6300129; № 6255458; № 5877397; № 5874299 и № 5545806; в публикациях согласно PCT WO91/10741, WO90/04036, WO 94/02602, WO 96/30498, WO 98/24893, а также в EP 546073B1 и EP 546073A1.

[76] Описанные выше трансгенные мыши, обозначенные в данном документе как мыши "HuMab", содержат минилокус гена иммуноглобулина человека, который кодирует неперестроенные последовательности тяжелой (мю и гамма) и легкой каппа цепей иммуноглобулина человека наряду с направленными мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы мю и каппа цепей (Lonberg et al., 1994, *Nature* 368:856-859). Соответственно, мыши проявляют сниженную экспрессию мышинового IgM или каппа-цепи, и в ответ на иммунизацию введенные трансгены человеческих тяжелой и легкой цепей подвергаются переключению класса и соматическому мутагенезу с получением высокоаффинных человеческих моноклональных антител IgG с каппа-цепью (Lonberg et al., выше.; Lonberg and Huszar, 1995, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93; Harding and Lonberg, 1995, *Ann. N.Y Acad. Sci.* 764:536-546). Получение мышей HuMab подробно описано в Taylor et al., 1992, *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen et al., 1993, *International Immunology* 5:647-656; Tuailon et al., 1994, *J. Immunol.* 152:2912-2920; Lonberg et al., 1994, *Nature* 368:856-859; Lonberg, 1994, *Handbook of Exp. Pharmacology* 113:49-101; Taylor et al., 1994, *International Immunology* 6:579-591; Lonberg and Huszar, 1995, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93; Harding and Lonberg, 1995, *Ann. N.Y Acad. Sci.* 764:536-546; Fishwild et al., 1996, *Nature Biotechnology* 14:845-851; указанные выше ссылки настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей. См. дополнительно патент США № 5545806; № 5569825; № 5625126; № 5633425; № 5789650; № 5877397; № 5661016; № 5814318; № 5874299 и № 5770429, а также патент США № 5545807; международные публикации №№ WO 93/1227; WO 92/22646 и WO 92/03918, раскрытия всех из которых настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей. Технологии, применяемые для получения человеческих антител в этих трансгенных мышях, описаны также в WO 98/24893 и Mendez et al., 1997, *Nature Genetics* 15:146-156, которые включены посредством ссылки.

[77] Антитела человеческого происхождения также могут быть получены с применением методик фагового дисплея. Фаговый дисплей описан, например, в Dower et al., WO 91/17271, McCafferty et al., WO 92/01047 и Caton and Koprowski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6450-6454 (1990), каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Антитела, полученные с помощью фаговой технологии, как правило, получают в виде антигенсвязывающих фрагментов, например фрагментов Fv или Fab у бактерий, а следовательно они лишены эффекторных функций. Эффекторные функции могут быть представлены одной из двух стратегий. Фрагменты могут быть встроены либо в полные антитела для экспрессии в клетках млекопитающих, либо в фрагменты биспецифических антител со вторым сайтом связывания, способным запускать эффекторную функцию, если это требуется. Как правило, фрагмент Fd (VH-CH1) и легкую цепь (VL-CL) антител отдельно клонируют с помощью ПЦР и случайным образом рекомбинируют в комбинаторных фаг-дисплейных библиотеках, которые затем могут быть отобраны для связывания с конкретным антигеном. Фрагменты антител экспрессируются на поверхности фага, и отбор Fv или Fab (а следовательно фага,

содержащего ДНК, кодирующую фрагмент антитела) путем связывания антигена осуществляется посредством нескольких раундов связывания и повторной амплификации антигена, - процедуры, называемой пэннингом. Фрагменты антител, специфические для антигена, обогащаются и, наконец, выделяются. Техники фагового дисплея также можно применять в подходе для гуманизации моноклональных антител грызунов, называемом "управляемым отбором" (см. Jespers, L. S., et al., *Bio/Technology* 12, 899-903 (1994)). Для этого фрагмент Fd моноклонального антитела мыши может быть отображен в комбинации с библиотекой легкой цепи человека, и полученная в результате гибридная библиотека Fab может быть затем отобрана с помощью антигена. Таким образом, фрагмент Fd мыши обеспечивает шаблон для отбора. Затем отобранные легкие цепи человека объединяют с библиотекой фрагментов Fd человека. Отбор полученной библиотеки дает полностью человеческий Fab.

[78] В определенных вариантах осуществления биспецифические антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению являются антителами. Используемый в данном документе термин "антитело" относится к тетрамерному белку иммуноглобулину, содержащему два полипептида легкой цепи (приблизительно по 25 кДа каждый) и два полипептида тяжелой цепи (приблизительно по 50-70 кДа каждый). Термин "легкая цепь" или "легкая цепь иммуноглобулина" относится к полипептиду, содержащему от аминоконца к карбоксильному концу одну переменную область легкой цепи иммуноглобулина (VL) и один константный домен легкой цепи (CL) иммуноглобулина. Константный домен легкой цепи (CL) иммуноглобулина может быть каппа- (κ) или лямбда- (λ)-типа. Термин "тяжелая цепь" или "тяжелая цепь иммуноглобулина" относится к полипептиду, содержащему от аминоконца к карбоксильному концу одну переменную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, константный домен 1 тяжелой цепи (CH1) иммуноглобулина, шарнирную область иммуноглобулина, константный домен 2 тяжелой цепи (CH2) иммуноглобулина, константный домен 3 тяжелой цепи (CH3) иммуноглобулина и необязательно константный домен 4 тяжелой цепи (CH4) иммуноглобулина. Тяжелые цепи классифицируют как мю- (μ), дельта- (Δ), гамма- (γ), альфа- (α) и эpsilon- (ϵ) цепь, и они определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. Классы антител IgG и IgA дополнительно делят на подклассы, а именно IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также IgA1 и IgA2, соответственно. Тяжелые цепи в антителах IgG, IgA и IgD содержат три домена (CH1, CH2 и CH3), тогда как тяжелые цепи в антителах IgM и IgE содержат четыре домена (CH1, CH2, CH3 и CH4). Константные домены тяжелой цепи иммуноглобулина могут быть из любого изотипа иммуноглобулина, в том числе из любого подтипа. Цепи антитела связаны друг с другом посредством межполипептидных дисульфидных связей между доменом CL и доменом CH1 (т. е. между легкой и тяжелой цепью) и между шарнирными областями тяжелых цепей антитела.

[79] В конкретных вариантах осуществления биспецифические антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению представляют собой

гетеродимерные антитела (используемые в данном документе взаимозаменяемо с "гетероиммуноглобулинами" или "гетеро-Ig"), которые относятся к антителам, содержащим две различные легкие цепи и две различные тяжелые цепи.

[80] Гетеродимерные антитела могут содержать любую константную область иммуноглобулина. Используемый в данном документе термин "константная область" относится ко всем доменам антитела, отличным от вариабельной области. Константная область не участвует непосредственно в связывании антигена, но проявляет различные эффекторные функции. Как описано выше, антитела делятся на конкретные изотипы (IgA, IgD, IgE, IgG и IgM) и подтипы (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 IgA2) в зависимости от аминокислотной последовательности константной области их тяжелых цепей. Константной областью легкой цепи может быть, например, константная область легкой цепи каппа- или лямбда-типа, например, константная область легкой цепи каппа- или лямбда-типа человека, которые обнаружены во всех пяти изотипах антител.

[81] Константная область тяжелой цепи гетеродимерных антител может представлять собой, например, константную область тяжелой цепи альфа-, дельта-, эpsilon-, гамма- или мю-типа, например, человеческую константную область тяжелой цепи альфа-, дельта-, эpsilon-, гамма- или мю-типа. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерные антитела содержат константную область тяжелой цепи из иммуноглобулина IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В одном варианте осуществления гетеродимерное антитело содержит константную область тяжелой цепи из человеческого иммуноглобулина IgG1. В другом варианте осуществления гетеродимерное антитело содержит константную область тяжелой цепи из человеческого иммуноглобулина IgG2.

[82] В одном варианте осуществления биспецифическое антитело по настоящему изобретению представляет собой DuoBodyTM. Дуотела можно получить с помощью технологической платформы DuoBodyTM (Genmab A/S), которая описана, например, в международных публикациях №№ WO 2008/119353, WO 2011/131746, WO 2011/147986 и WO 2013/060867, Labrijn A F et al., PNAS, 110(13): 5145-5150 (2013), Gramer et al., mAbs, 5(6): 962-973 (2013) и Labrijn et al., Nature Protocols, 9(10): 2450-2463 (2014). Данную технологию можно использовать для объединения одной половины первого моноспецифического антитела, содержащего две тяжелые и две легкие цепи, с одной половиной второго моноспецифического антитела, содержащего две тяжелые и две легкие цепи. Полученный гетеродимер содержит одну тяжелую цепь и одну легкую цепь из первого антитела, спаренные с одной тяжелой цепью и одной легкой цепью из второго антитела. Если оба моноспецифических антитела распознают разные эпитопы на разных антигенах, то полученный гетеродимер представляет собой биспецифическое антитело.

[83] Что касается платформы DuoBodyTM, каждое из моноспецифических антител содержит константную область тяжелой цепи с одиночной точечной мутацией в домене СН3. Данные точечные мутации делают возможным более сильное взаимодействие между доменами СН3 в полученном биспецифическом антителе, чем между доменами СН3 в любом из моноспецифических антител без мутаций. Одиночная точечная мутация в

каждом моноспецифическом антителе может находиться при остатке 366, 368, 370, 399, 405, 407 или 409 (нумерация EU) в домене СН3 константной области тяжелой цепи (см. WO 2011/131746). Более того, одиночная точечная мутация локализована при другом остатке в одном моноспецифическом антителе по сравнению с другим моноспецифическим антителом. Например, одно моноспецифическое антитело может содержать мутацию F405L (нумерация EU; мутация с заменой фенилаланина на лейцин по остатку 405) или одну из мутаций F405A, F405D, F405E, F405H, F405I, F405K, F405M, F405N, F405Q, F405S, F405T, F405V, F405W и F405Y, тогда как другое моноспецифическое антитело может содержать мутацию K409R (нумерация EU; мутация с заменой лизина на аргинин по остатку 409). Константные области тяжелой цепи моноспецифических антител могут принадлежать к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (например к изотипу человеческого IgG1), и биспецифическое антитело, полученное посредством технологии DuoBody™, можно модифицировать для изменения (например снижения) Fc-опосредованных эффекторных функций и/или увеличения периода полужизни. Один способ получения DuoBody™ предусматривает следующее: (i) отдельную экспрессию двух исходных IgG1, содержащих совпадающие одиночные точечные мутации (т. е. K409R и F405L (или одну из мутаций F405A, F405D, F405E, F405H, F405I, F405K, F405M, F405N, F405Q, F405S, F405T, F405V, F405W и F405Y) (нумерация EU)) в домене СН3; (ii) смешивание исходных IgG1 в пермиссивных окислительно-восстановительных условиях *in vitro*, что делает возможным рекомбинацию полумолекул; (iii) удаление восстановителя для обеспечения возможности повторного окисления межцепочечных дисульфидных связей, и (iv) анализ эффективности обмена и конечного продукта с применением способов на основе хроматографии или масс-спектрометрии (MS) (см. Labrijn et al., Nature Protocols, 9(10): 2450-2463 (2014)).

[84] Другой иллюстративный способ получения биспецифических антител предусматривает применение технологии выступы-в-углубления (Ridgway et al., Protein Eng., 9:617-621 (1996); WO 2006/028936). Проблема неправильного образования пар тяжелых цепей Ig, которая является основным недостатком получения биспецифических антител, уменьшается при применении данной технологии посредством осуществления мутации выбранных аминокислот, образующих поверхность взаимодействия доменов СН3 в IgG. В положениях в пределах домена СН3, в которых две тяжелые цепи взаимодействуют напрямую, аминокислота с небольшой боковой цепью (углубление) вводится в последовательность одной тяжелой цепи, а аминокислота с крупной боковой цепью (выступ) вводится в положение противоположного взаимодействующего остатка на другой тяжелой цепи. В некоторых случаях антитела по настоящему изобретению содержат цепи иммуноглобулина, в которых домены СН3 были модифицированы посредством осуществления мутации выбранных аминокислот, которые взаимодействуют на поверхности взаимодействия между двумя полипептидами, таким образом, что предпочтительно образуется биспецифическое антитело. Биспецифические антитела могут состоять из цепей иммуноглобулина одного и того же подкласса или различных

подклассов. В одном случае биспецифическое антитело, которое связывается с gp120 и CD3, содержит мутацию T366W (нумерация EU) в "цепи с выступами" и мутации T366S, L368A, Y407V нумерация 9EU) в "цепи с углублением". В определенных вариантах осуществления дополнительный межцепочечный дисульфидный мостик вводится между доменами СН3, например посредством введения мутации Y349C в "цепь с выступами" и мутации E356C или мутации S354C в "цепь с углублением". В определенных вариантах осуществления мутации R409D, K370E вводятся в "цепь с выступами", а мутации D399K, E357K вводятся в "цепь с углублением". В других вариантах осуществления мутации Y349C, T366W вводятся в одну из цепей, а мутации E356C, T366S, L368A, Y407V вводятся в противоположную цепь. В некоторых вариантах осуществления мутации Y349C, T366W вводятся в одну цепь, а мутации S354C, T366S, L368A, Y407V вводятся в противоположную цепь. В некоторых вариантах осуществления мутации Y349C, T366W вводятся в одну цепь, а мутации S354C, T366S, L368A, Y407V вводятся в противоположную цепь. В еще одних вариантах осуществления мутации Y349C, T366W вводятся в одну цепь, а мутации S354C, T366S, L368A, Y407V вводятся в противоположную цепь (все согласно нумерации EU).

[85] Еще одним способом получения биспецифических антител является технология CrossMab. CrossMab представляют собой химерные антитела, состоящие из половин двух полноразмерных антител. Для надлежащего образования пар цепей она сочетает в себе две технологии: (i) выступ-в-углубление, что способствует надлежащему образованию пар между двумя тяжелыми цепями, и (ii) обмен между тяжелой и легкой цепями одного из двух Fab для введения асимметрии, что позволяет избежать ненадлежащего образования пар легких цепей. См. Ridgway et al., *Protein Eng.*, 9:617-621 (1996); Schaefer et al., *PNAS*, 108:11187-11192 (2011). CrossMab могут сочетать в себе два или более антигенсвязывающих доменов для нацеливания на две или более мишеней или для внедрения бивалентности к одной мишени, например в формате 2:1.

[86] Для облегчения связывания конкретной тяжелой цепи с ее когнатной легкой цепью как тяжелая, так и легкая цепи могут содержать взаимодополняющие аминокислотные замены. Используемый в данном документе термин "взаимодополняющие аминокислотные замены" относится к замене положительно заряженной аминокислоты в одной цепи в паре с заменой отрицательно заряженной аминокислоты в другой цепи. Например, в некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену с введением заряженной аминокислоты, и соответствующая легкая цепь содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену с введением заряженной аминокислоты, где заряженная аминокислота, введенная в тяжелую цепь, характеризуется зарядом, противоположным заряду аминокислоты, введенной в легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления один или несколько положительно заряженных остатков (например, лизин, гистидин или аргинин) можно ввести в первую легкую цепь (LC1) и один или несколько отрицательно заряженных остатков (например, аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту)

можно ввести в сопутствующую тяжелую цепь (HC1) на поверхности связывания LC1/HC1, тогда как один или несколько отрицательно заряженных остатков (например аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту) можно ввести во вторую легкую цепь (LC2) и один или несколько положительно заряженных остатков (например, лизин, гистидин или аргинин) можно ввести в сопутствующую тяжелую цепь (HC2) на поверхности связывания LC2/HC2. Электростатические взаимодействия будут направлять LC1 к образованию пары с HC1, а LC2 к образованию пары с HC2, поскольку противоположно заряженные остатки (полярность) на поверхности взаимодействия притягиваются. Пары тяжелой/легкой цепи с одинаковыми заряженными остатками (полярность) на поверхности взаимодействия (например LC1/HC2 и LC2/HC1) будут отталкиваться, что приведет к подавлению образования нежелательных пар HC/LC.

[87] В этих и других вариантах осуществления домен CH1 тяжелой цепи или домен CL легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности IgG дикого типа, таким образом, что одна или несколько положительно заряженных аминокислот в аминокислотной последовательности IgG дикого типа заменены на одну или несколько отрицательно заряженных аминокислот. В качестве альтернативы, домен CH1 тяжелой цепи или домен CL легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности IgG дикого типа, таким образом, что одна или несколько отрицательно заряженных аминокислот в аминокислотной последовательности IgG дикого типа заменены на одну или несколько положительно заряженных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислот в домене CH1 первой и/или второй тяжелой цепи в гетеродимерном антителе в положении согласно EU, выбранном из F126, P127, L128, A141, L145, K147, D148, H168, F170, P171, V173, Q175, S176, S183, V185 и K213, заменены на заряженную аминокислоту. В определенных вариантах осуществления предпочтительным остатком для замены на отрицательно или положительно заряженную аминокислоту является S183 (система нумерации EU). В некоторых вариантах осуществления S183 заменен на положительно заряженную аминокислоту. В альтернативных вариантах осуществления S183 заменен на отрицательно заряженную аминокислоту. Например, в одном варианте осуществления S183 заменен на отрицательно заряженную аминокислоту (например S183E) в первой тяжелой цепи, и S183 заменен на положительно заряженную аминокислоту (например S183K) во второй тяжелой цепи.

[88] В вариантах осуществления, в которых легкая цепь представляет собой легкую каппа-цепь, одна или несколько аминокислот в домене CL первой и/или второй легкой цепи в гетеродимерном антителе в положении (нумерация EU и согласно Kabat в легкой каппа-цепи), выбранном из F116, F118, S121, D122, E123, Q124, S131, V133, L135, N137, N138, Q160, S162, T164, S174 и S176, заменены на заряженную аминокислоту. В вариантах осуществления, в которых легкая цепь представляет собой легкую ламбда-цепь, одна или несколько аминокислот в домене CL первой и/или второй легкой цепи в

гетеродимерном антителе в положении (нумерация согласно Kabat в лямбда-цепи), выбранном из T116, F118, S121, E123, E124, K129, T131, V133, L135, S137, E160, T162, S165, Q167, A174, S176 и Y178, заменены на заряженную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления предпочтительным остатком для замены на отрицательно или положительно заряженную аминокислоту является S176 (система нумерации EU и согласно Kabat) домена CL легкой каппа- или лямбда-цепи. В определенных вариантах осуществления S176 домена CL заменен на положительно заряженную аминокислоту. В альтернативных вариантах осуществления S176 домена CL заменен на отрицательно заряженную аминокислоту. В одном варианте осуществления S176 заменен на положительно заряженную аминокислоту (например S176K) в первой легкой цепи, и S176 заменен на отрицательно заряженную аминокислоту (например S176E) во второй легкой цепи.

[89] В дополнение или в качестве альтернативы взаимодополняющим аминокислотным заменам в доменах CH1 и CL переменные области легкой и тяжелой цепей в гетеродимерном антителе могут содержать одну или несколько взаимодополняющих аминокислотных замен для введения заряженных аминокислот. Например, в некоторых вариантах осуществления VH-область тяжелой цепи или VL-область легкой цепи гетеродимерного антитела содержит аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности IgG дикого типа, таким образом, что одна или несколько положительно заряженных аминокислот в аминокислотной последовательности IgG дикого типа заменены на одну или несколько отрицательно заряженных аминокислот. В качестве альтернативы, VH-область тяжелой цепи или VL-область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности IgG дикого типа, таким образом, что одна или несколько отрицательно заряженных аминокислот в аминокислотной последовательности IgG дикого типа заменены на одну или несколько положительно заряженных аминокислот.

[90] Остатки на поверхности взаимодействия V-области (т. е. аминокислотные остатки, которые опосредуют сборку VH- и VL-областей) в пределах VH-области включают положения 1, 3, 35, 37, 39, 43, 44, 45, 46, 47, 50, 59, 89, 91 и 93 согласно Kabat. Один или несколько из этих остатков на поверхности взаимодействия в VH-области можно заменить на заряженную (положительно или отрицательно заряженную) аминокислоту. В определенных вариантах осуществления аминокислота в положении 39 согласно Kabat в VH-области первой и/или второй тяжелой цепи заменена на положительно заряженную аминокислоту, например лизин. В альтернативных вариантах осуществления аминокислота в положении 39 согласно Kabat в VH-области первой и/или второй тяжелой цепи заменена на отрицательно заряженную аминокислоту, например глутаминовую кислоту. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении 39 согласно Kabat в VH-области первой тяжелой цепи заменена на отрицательно заряженную аминокислоту (например G39E), а аминокислота в положении

39 согласно Kabat в VH-области второй тяжелой цепи заменена на положительно заряженную аминокислоту (например G39K). В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении 44 согласно Kabat в VH-области первой и/или второй тяжелой цепи заменена на положительно заряженную аминокислоту, например лизин. В альтернативных вариантах осуществления аминокислота в положении 44 согласно Kabat в VH-области первой и/или второй тяжелой цепи заменена на отрицательно заряженную аминокислоту, например глутаминовую кислоту. В определенных вариантах осуществления аминокислота в положении 44 согласно Kabat в VH-области первой тяжелой цепи заменена на отрицательно заряженную аминокислоту (например G44E), а аминокислота в положении 44 согласно Kabat в VH-области второй тяжелой цепи заменена на положительно заряженную аминокислоту (например G44K).

[91] Остатки на поверхности взаимодействия V-области (т. е. аминокислотные остатки, которые опосредуют сборку VH- и VL-областей) в пределах VL-области включают положения 32, 34, 35, 36, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50, 51, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 85, 87, 89, 90, 91 и 100 согласно Kabat. Один или несколько остатков на поверхности взаимодействия в VL-области можно заменить на заряженную аминокислоту, предпочтительно на аминокислоту, которая характеризуется зарядом, противоположным заряду тех аминокислот, которые введены в VH-область когнатной тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении 100 согласно Kabat в VL-области первой и/или второй легкой цепи заменена на положительно заряженную аминокислоту, например лизин. В альтернативных вариантах осуществления аминокислота в положении 100 согласно Kabat в VL-области первой и/или второй легкой цепи заменена на отрицательно заряженную аминокислоту, например глутаминовую кислоту. В определенных вариантах осуществления аминокислота в положении 100 согласно Kabat в VL-области первой легкой цепи заменена на положительно заряженную аминокислоту (например G100K), а аминокислота в положении 100 согласно Kabat в VL-области второй легкой цепи заменена на отрицательно заряженную аминокислоту (например G100E).

[92] В определенных вариантах осуществления гетеродимерное антитело по настоящему изобретению содержит первую тяжелую цепь и вторую тяжелую цепь, а также первую легкую цепь и вторую легкую цепь, где первая тяжелая цепь содержит аминокислотные замены в положениях 44 (Kabat), 183 (EU), 392 (EU) и 409 (EU), где вторая тяжелая цепь содержит аминокислотные замены в положениях 44 (Kabat), 183 (EU), 356 (EU) и 399 (EU), где первая и вторая легкие цепи содержат аминокислотную замену в положениях 100 (Kabat) и 176 (EU), и где посредством аминокислотных замен в указанные положения вводится заряженная аминокислота. В связанных вариантах осуществления глицин в положении 44 (Kabat) первой тяжелой цепи заменен на глутаминовую кислоту, глицин в положении 44 (Kabat) второй тяжелой цепи заменен на лизин, глицин в положении 100 (Kabat) первой легкой цепи заменен на лизин, глицин в положении 100 (Kabat) второй легкой цепи заменен на глутаминовую кислоту, серин в

положении 176 (EU) первой легкой цепи заменен на лизин, серин в положении 176 (EU) второй легкой цепи заменен на глутаминовую кислоту, серин в положении 183 (EU) первой тяжелой цепи заменен на глутаминовую кислоту, лизин в положении 392 (EU) первой тяжелой цепи заменен на аспарагиновую кислоту, лизин в положении 409 (EU) первой тяжелой цепи заменен на аспарагиновую кислоту, серин в положении 183 (EU) второй тяжелой цепи заменен на лизин, глутаминовая кислота в положении 356 (EU) второй тяжелой цепи заменена на лизин и/или аспарагиновая кислота в положении 399 (EU) второй тяжелой цепи заменена на лизин.

[93] Используемый в данном документе термин "Fc-область" относится к С-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которую можно получить посредством расщепления папаином интактного антитела. Fc-область иммуноглобулина обычно содержит два константных домена, домен CH2 и домен CH3, и необязательно содержит домен CH4. В определенных вариантах осуществления Fc-область представляет собой Fc-область иммуноглобулина IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит домены CH2 и CH3 из иммуноглобулина IgG1 человека или IgG2 человека. Fc-область может сохранять эффекторную функцию, такую как связывание C1q, комплементзависимая цитотоксичность (CDC), связывание Fc-рецептора, антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC) и фагоцитоз. В других вариантах осуществления Fc-область может быть модифицирована для снижения или устранения эффекторной функции, как более подробно описано в данном документе.

[94] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению связывающий домен, расположенный на карбоксильном конце Fc-области (т. е. карбоксиконцевой связывающий домен), представляет собой scFv. В определенных вариантах осуществления scFv содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), соединенные пептидным линкером. Переменные области могут быть ориентированы в пределах scFv в ориентации VH-VL или VL-VH. Например, в одном варианте осуществления scFv содержит от N-конца к С-концу VH-область, пептидный линкер и VL-область. В другом варианте осуществления scFv содержит от N-конца к С-концу VL-область, пептидный линкер и VH-область. VH- и VL-области scFv могут содержать одну или несколько замен на цистеин для обеспечения образования дисульфидной связи между VH- и VL-областями. Такие цистеиновые "зажимы" стабилизируют два переменных домена в антигенсвязывающей конфигурации. В одном варианте осуществления в каждом из положения 44 (нумерация согласно Kabat) в VH-области и положения 100 (нумерация согласно Kabat) в VL-области осуществлена замена на остаток цистеина.

[95] В определенных вариантах осуществления scFv слит или иным образом соединен на своем аминоконце с карбоксильным концом Fc-области (например карбоксильным концом домена CH3) посредством пептидного линкера. Таким образом, в одном варианте осуществления scFv слит с Fc-областью таким образом, что полученный

слитый белок содержит от N-конца к С-концу домен CH2, домен CH3, первый пептидный линкер, VH-область, второй пептидный линкер и VL-область. В другом варианте осуществления scFv слит с Fc-областью таким образом, что полученный слитый белок содержит от N-конца к С-концу домен CH2, домен CH3, первый пептидный линкер, VL-область, второй пептидный линкер и VH-область. "Слитый белок" представляет собой белок, который содержит полипептидные компоненты, полученные из более чем одного исходного белка или полипептида. Как правило, слитый белок экспрессируется со слитого гена, в котором нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептидную последовательность одного белка, соединена в одной рамке считывания с нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептидную последовательность другого белка, и необязательно отделена от нее посредством линкера. Затем слитый ген может экспрессироваться рекомбинантной клеткой-хозяином с продуцированием единого слитого белка.

[96] Термин "пептидный линкер" относится к олигопептиду из от приблизительно 2 до приблизительно 50 аминокислот, который ковалентно соединяет один полипептид с другим полипептидом. Пептидные линкеры можно использовать для соединения доменов VH и VL в пределах scFv. Пептидные линкеры также можно использовать для соединения scFv, Fab-фрагмента или другого функционального фрагмента антитела с аминоконцом или карбоксильным концом Fc-области с созданием биспецифических антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе. Предпочтительно длина пептидных линкеров составляет по меньшей мере 5 аминокислот. В определенных вариантах осуществления длина пептидных линкеров составляет от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 40 аминокислот. В других вариантах осуществления длина пептидных линкеров составляет от приблизительно 8 аминокислот до приблизительно 30 аминокислот. В еще одних вариантах осуществления длина пептидных линкеров составляет от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 20 аминокислот.

[97] Предпочтительно, но не обязательно, пептидный линкер содержит аминокислоты из числа двадцати канонических аминокислот, в частности цистеин, глицин, аланин, пролин, аспарагин, глутамин и/или серин. В определенных вариантах осуществления пептидный линкер состоит по большей части из стерически незатрудненных аминокислот, таких как глицин, серин и аланин. Таким образом, линкеры, которые предпочтительны в некоторых вариантах осуществления, включают полиглицины, полисерины и полиаланины или комбинации любых из них. Некоторые иллюстративные пептидные линкеры включают без ограничения поли(Gly)₂₋₈, в частности (Gly)₃ (SEQ ID NO: 22), (Gly)₄ (SEQ ID NO: 23), (Gly)₅ (SEQ ID NO: 24), (Gly)₆ (SEQ ID NO: 25) и (Gly)₇ (SEQ ID NO: 26), а также поли(Gly)₄Ser, поли(Gly-Ala)₂₋₄ и поли(Ala)₂₋₈. В определенных вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой (Gly_xSer)_n, где x=3 или 4, и n=2, 3, 4, 5 или 6. Такие пептидные линкеры включают "L5" (GGGGS или "G₄S"; SEQ ID NO: 27), "L9" (GGGSGGGGS или "G₃SG₄S"; SEQ ID NO: 28), "L10"

(GGGGSGGGGS или "(G₄S)₂"; SEQ ID NO: 29), "L15" (GGGGSGGGGSGGGGGS или "(G₄S)₃"; SEQ ID NO: 31) и "L25" (GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS или "(G₄S)₅"; SEQ ID NO: 32). В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер, соединяющий VH- и VL-области в пределах scFv, представляет собой линкер L15 или (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 31). В этих и других вариантах осуществления пептидный линкер, соединяющий карбоксиконцевой связывающий домен (например scFv или Fab) с С-концом Fc-области, представляет собой линкер L9 или G₃SG₄S (SEQ ID NO: 28) или линкер L10 (G₄S)₂ (SEQ ID NO: 29).

[98] Другие конкретные примеры пептидных линкеров, которые можно использовать в биспецифических антигенсвязывающих белках по настоящему изобретению, включают (Gly)₅Lys (SEQ ID NO: 1); (Gly)₅LysArg (SEQ ID NO: 2); (Gly)₃Lys(Gly)₄ (SEQ ID NO: 3); (Gly)₃AsnGlySer(Gly)₂ (SEQ ID NO: 4); (Gly)₃Cys(Gly)₄ (SEQ ID NO: 5); GlyProAsnGlyGly (SEQ ID NO: 6); GGEGGG (SEQ ID NO: 7); GGEEEGGG (SEQ ID NO: 8); GEEEG (SEQ ID NO: 9); GEEE (SEQ ID NO: 10); GGDGGG (SEQ ID NO: 11); GGDDDG (SEQ ID NO: 12); GDDDG (SEQ ID NO: 13); GDDD (SEQ ID NO: 14); GGGGSDDSDEGSDGEDGGGG (SEQ ID NO: 15); WEWEW (SEQ ID NO: 16); FEFEF (SEQ ID NO: 17); EEEWW (SEQ ID NO: 18); EEEFFF (SEQ ID NO: 19); WEEEEWW (SEQ ID NO: 20) и FFEEFF (SEQ ID NO: 21).

[99] Константные области тяжелой цепи или Fc-области описанных в данном документе биспецифических антигенсвязывающих белков могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, которые оказывают влияние на гликозилирование и/или эффекторную функцию антигенсвязывающего белка. Одна из функций Fc-области иммуноглобулина заключается в том, чтобы сообщать иммунной системе, в случае если иммуноглобулин связывается со своей мишенью. Это обычно называют "эффекторной функцией". Взаимодействие приводит к антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), антителозависимому клеточному фагоцитозу (ADCP) и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC). ADCC и ADCP опосредуются связыванием Fc-области с рецепторами Fc на поверхности клеток иммунной системы. CDC опосредуется посредством связывания Fc с белками системы комплемента, например C1q. В некоторых вариантах осуществления биспецифические антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению содержат одну или несколько аминокислотных замен в константной области для усиления эффекторной функции, в том числе ADCC-активности, CDC-активности, ADCP-активности и/или клиренса или увеличения периода полужизни антигенсвязывающего белка. Иллюстративные аминокислотные замены (нумерация EU), которые могут усиливать эффекторную функцию, включают без ограничения E233L, L234I, L234Y, L235S, G236A, S239D, F243L, F243V, P247I, D280H, K290S, K290E, K290N, K290Y, R292P, E294L, Y296W, S298A, S298D, S298V, S298G, S298T, T299A, Y300L, V305I, Q311M, K326A, K326E, K326W, A330S, A330L, A330M, A330F, I332E, D333A, E333S, E333A, K334A, K334V, A339D, A339Q, P396L или комбинации любых из вышеперечисленных.

[100] В других вариантах осуществления биспецифические антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению содержат одну или несколько аминокислотных замен в константной области для снижения эффекторной функции. Иллюстративные аминокислотные замены (нумерация EU), которые могут снижать эффекторную функцию, включают без ограничения C220S, C226S, C229S, E233P, L234A, L234V, V234A, L234F, L235A, L235E, G237A, P238S, S267E, H268Q, N297A, N297G, V309L, E318A, L328F, A330S, A331S, P331S или комбинации любых из вышеперечисленных.

[101] Гликозилирование может способствовать эффекторной функции антител, в частности антител IgG1. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления биспецифические антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, которые влияют на уровень или тип гликозилирования связывающих белков. Гликозилирование полипептидов обычно является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанный относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту за исключением пролина, представляют собой последовательности распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксикампоаминокислоте, наиболее часто серину или треонину, хотя также можно использовать 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин.

[102] В определенных вариантах осуществления гликозилирование биспецифических антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе, повышено за счет добавления одного или нескольких сайтов гликозилирования, например к Fc-области связывающего белка. Добавление сайтов гликозилирования к антигенсвязывающему белку может быть с удобством осуществлено путем модификации аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или несколько описанных выше трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования). Перестройка также может быть осуществлена путем добавления или замены одного или нескольких сериновых или треониновых остатков к исходной последовательности (для O-связанных сайтов гликозилирования). Для ясности, аминокислотная последовательность антигенсвязывающего белка может быть изменена посредством изменений на уровне ДНК, в частности, путем мутации ДНК, кодирующей целевой полипептид, в предварительно выбранных основаниях, так что образуются кодоны, которые будут транслироваться в требуемые аминокислоты.

[103] Настоящее изобретение также охватывает получение молекул биспецифических антигенсвязывающих белков с измененной структурой углеводов, что приводит к изменению эффекторной активности, включая антигенсвязывающие белки с

отсутствующим или сниженным фукозилированием, которые проявляют повышенную ADCC-активность. Из уровня техники известны различные способы уменьшения или исключения фукозилирования. Например, эффекторная активность ADCC опосредуется связыванием молекулы антитела с рецептором FcγRIII, который, как было показано, зависит от углеводной структуры N-связанного гликозилирования у остатка N297 домена CH2. Нефукозилированные антитела связываются с этим рецептором с повышенной аффинностью и запускают эффекторные функции, опосредуемые FcγRIII, более эффективно, чем нативные, фукозилированные антитела. Например, рекомбинантное получение нефукозилированного антитела в клетках CHO, в которых фермент альфа-1,6-фукозилтрансфераза был нокаутирован, приводит к получению антитела со 100-кратно повышенной активностью ADCC (см. Yamane-Ohnuki et al., *Biotechnol Bioeng.* 87(5):614-22, 2004). Подобные эффекты могут быть достигнуты посредством снижения активности фермента альфа-1,6-фукозилтрансферазы или других ферментов в пути фукозилирования, например, посредством обработки siRNA или антисмысловой РНК, конструирования клеточных линий для нокаута фермента(-ов) или культивирования с селективными ингибиторами гликозилирования (см. Rothman et al., *Mol Immunol.* 26 (12): 1113-23, 1989). Некоторые штаммы клеток-хозяев, например Lec13 или клеточная линия гибридомы YB2/0 крысы, естественным путем продуцируют антитела с более низкими уровнями фукозилирования (см. Shields et al., *J Biol Chem.* 277(30):26733-40, 2002 и Shinkawa et al., *J Biol Chem.* 278(5):3466-73, 2003). Также было установлено, что увеличение уровня разветвленных углеводов, например, посредством рекомбинантного продуцирования антитела в клетках, которые сверхэкспрессируют фермент GnTIII, также вызывает повышение активности ADCC (см. Umana et al., *Nat Biotechnol.* 17(2):176-80, 1999).

[104] В других вариантах осуществления гликозилирование биспецифических антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе, снижено или исключено за счет удаления одного или нескольких сайтов гликозилирования, например из Fc-области связывающего белка. Аминокислотные замены, которые исключают или модифицируют N-связанные сайты гликозилирования, могут уменьшать или исключать N-связанное гликозилирование антигенсвязывающего белка. В определенных вариантах осуществления биспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в данном документе, содержат мутацию в положении N297 (нумерация EU), такую как N297Q, N297A или N297G. В одном конкретном варианте осуществления биспецифические антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению содержат Fc-область из человеческого антитела IgG1 с мутацией N297G. Для улучшения стабильности молекул, содержащих мутацию N297, Fc-область молекул может быть дополнительно сконструирована. Например, в некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислот в Fc-области заменены цистеином в целях содействия образованию дисульфидной связи в димерном состоянии. Таким образом, остатки, соответствующие V259, A287, R292, V302, L306, V323 или I332 (нумерация EU) Fc-области IgG1, могут быть замещены цистеином. Предпочтительно, конкретные пары остатков замещены

цистеином так, что они предпочтительно образуют дисульфидную связь друг с другом, ограничивая таким образом или предотвращая скремблирование дисульфидной связи. Предпочтительные пары включают без ограничения A287C и L306C, V259C и L306C, R292C и V302C и V323C и I332C. В конкретных вариантах осуществления биспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в данном документе, содержат Fc-область из человеческого антитела IgG1 с мутациями R292C и V302C. В таких вариантах осуществления Fc-область также может содержать мутацию N297G.

[105] Также могут быть желательны модификации биспецифических антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению для увеличения периода полужизни в сыворотке крови, например, посредством включения или добавления эпитопа, связывающего рецептор реутилизации (например посредством мутации в соответствующей области или посредством включения эпитопа в пептидную метку, которая затем сливается с антигенсвязывающим белком на любом конце или в середине, например посредством синтеза ДНК или пептида; см., например WO96/32478), или добавления молекул, таких как PEG или другие водорастворимые полимеры, включая полисахаридные полимеры. Эпитоп, связывающий рецептор реутилизации, предпочтительно состоит из области, где любые один или несколько аминокислотных остатков из одной или двух петель Fc-области переносятся в аналогичное положение антигенсвязывающего белка. Еще более предпочтительно, переносятся три или больше остатков из одной или двух петель Fc-области. Еще более предпочтительно, эпитоп взят из домена CH2 Fc-области (например, Fc-области IgG) и перенесен в область CH1, CH3 или VH или в более чем одну такую область антигенсвязывающего белка. Как альтернатива, эпитоп взят из домена CH2 Fc-области и перенесен на область CL или область VL или обе области антигенсвязывающего белка. См. международные заявки WO 97/34631 и WO 96/32478 для описания вариантов Fc и их взаимодействия с рецептором реутилизации.

[106] Настоящее изобретение включает одну или несколько выделенных нуклеиновых кислот, кодирующих биспецифические антигенсвязывающие белки и их компоненты, описанные в данном документе. Молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению включают ДНК и РНК как в одноцепочечной, так и в двухцепочечной форме, а также соответствующие комплементарные последовательности. ДНК включает, например, кДНК, геномную ДНК, химически синтезированную ДНК, ДНК, амплифицированную с помощью ПЦР, и их комбинации. Молекулы нуклеиновых кислот по настоящему изобретению включают полноразмерные гены или молекулы кДНК, а также комбинацию их фрагментов. Нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению предпочтительно получают из человеческих источников, но настоящее изобретение включает также и нуклеиновые кислоты, полученные от видов, отличных от человека.

[107] Соответствующие аминокислотные последовательности из иммуноглобулина или его области (например, варибельной области, Fc-области и т. д.) или

представляющего интерес полипептида могут быть определены посредством прямого секвенирования белка, и подходящие кодирующие нуклеотидные последовательности могут быть сконструированы в соответствии с универсальной таблицей кодонов. В качестве альтернативы, геномную ДНК или cDNA, кодирующую моноклональные антитела, из которых можно получить связывающие домены биспецифических антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению, можно выделять и секвенировать из клеток, продуцирующих такие антитела, с применением общепринятых процедур (например с применением олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи моноклональных антител).

[108] Термин "выделенная нуклеиновая кислота", который применяется в данном документе взаимозаменяемо с термином "выделенный полинуклеотид", представляет собой нуклеиновую кислоту, которая была отделена от смежных генетических последовательностей, присутствующих в геноме организма, из которого нуклеиновая кислота была выделена, в случае нуклеиновых кислот, выделенных из встречающихся в природе источников. В случае нуклеиновых кислот, синтезированных ферментативно из матрицы или химически, таких как продукты ПЦР, молекулы кДНК или, например, олигонуклеотиды, понятно, что нуклеиновые кислоты, образующиеся в результате таких процессов, представляют собой выделенные нуклеиновые кислоты. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты относится к молекуле нуклеиновой кислоты в виде отдельного фрагмента или в качестве компонента более крупной конструкции нуклеиновой кислоты. В одном предпочтительном варианте осуществления изобретения нуклеиновые кислоты фактически свободны от загрязняющего эндогенного материала. Молекулу нуклеиновой кислоты предпочтительно получают из ДНК или РНК, выделенной по меньшей мере один раз, фактически в чистой форме и в количестве или концентрации, дающих возможность идентифицировать, манипулировать и восстанавливать составляющие ее нуклеотидные последовательности с помощью стандартных биохимических способов (таких, как описанные в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Такие последовательности предпочтительно предоставляются и/или сконструированы в виде открытой рамки считывания, не прерываемой внутренними нетранслируемыми последовательностями или интронами, которые обычно присутствуют в эукариотических генах. Последовательности нетранслируемой ДНК могут быть представлены 5'- или 3'-концами из открытой рамки считывания, где то же самое не мешает манипуляции или экспрессии кодирующей области. Если не указано иное, то левый конец любой обсуждаемой в данном документе одноцепочечной полинуклеотидной последовательности является 5'-концом; левое направление двухцепочечных полинуклеотидных последовательностей называется 5'-направлением. Направление от 5'- к 3'-концу, в котором происходит наращивание образующихся РНК-транскриптов, называется направлением транскрипции; области последовательности цепи ДНК, содержащие такую же последовательность, что и РНК-

транскрипт, которые расположены в 5'-направлении относительно 5'-конца РНК-транскрипта, называются "вышележащими последовательностями"; области последовательности цепи ДНК, содержащие такую же последовательность, что и РНК-транскрипт, которые расположены в 3'-направлении относительно 3'-конца РНК-транскрипта, называются "нижележащими последовательностями".

[109] Настоящее изобретение также включает нуклеиновые кислоты, которые гибридизуются в умеренно строгих условиях и, более предпочтительно, в очень жестких условиях с нуклеиновыми кислотами, кодирующими полипептиды, как описано в данном документе. Основные параметры, влияющие на выбор условий гибридизации, и руководство для разработки подходящих условий приведены в Sambrook, Fritsch, and Maniatis (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., главы 9 и 11, и *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., разделы 2.10 и 6.3-6.4), и могут быть легко определены специалистами обычной квалификации в данной области техники, исходя, например, из длины и/или нуклеотидного состава нуклеиновой кислоты. Один из способов достижения умеренно строгих условий включает использование раствора для предварительной промывки, содержащего 5 x SSC, 0,5% SDS, 1,0 mM EDTA (pH 8,0), гибридизационный буфер с приблизительно 50% формамида, 6 x SSC и температуру гибридизации приблизительно 55°C (или другие подобные гибридизационные растворы, такие как раствор, содержащий приблизительно 50% формамида, с температурой гибридизации приблизительно 42°C) и условия промывания приблизительно 60°C, в 0,5 x SSC, 0,1% SDS. Как правило, очень жесткие условия определяются как условия гибридизации, как указано выше, но с промывкой при приблизительно 68°C, 0,2 x SSC, 0,1% SDS. SSPE (1 x SSPE представляет собой 0,15 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄ и 1,25 mM EDTA, pH 7,4) можно заменить на SSC (1 x SSC представляет собой 0,15 M NaCl и 15 mM цитрата натрия) в буферах для гибридизации и промывки; промывки осуществляют в течение 15 минут после завершения гибридизации. Следует понимать, что температуру промывки и концентрацию промывочной соли можно регулировать по мере необходимости для достижения требуемой степени жесткости, с использованием основных принципов, с помощью которых регулируют реакции гибридизации и стабильность дуплекса, как известно специалистам в данной области техники и дополнительно описано ниже (см., например, Sambrook et al., 1989). При гибридизации нуклеиновой кислоты с целевой нуклеиновой кислотой неизвестной последовательности предполагают, что длина гибрида равна длине гибридизующейся нуклеиновой кислоты. В случае если гибридизуют нуклеиновые кислоты известной последовательности, - длина гибрида может быть определена путем выравнивания последовательностей нуклеиновых кислот и определения области или областей комплементарности оптимальной последовательности. Температура гибридизации для гибридов, предполагаемая длина которых составляет меньше чем 50 пар оснований, должна быть на 5-10°C ниже температуры плавления (T_m) гибрида, где T_m определяют в соответствии со следующими

уравнениями. Для гибридов длиной меньше чем 18 пар оснований $T_m (^{\circ}C)=2$ (количество оснований A+T) + 4(количество оснований G+C). Для гибридов длиной более 18 пар оснований $T_m (^{\circ}C)=81,5+16,6 (\log_{10} [Na^{+}]) + 0,41 (\% G+C) - (600/N)$, где N представляет собой количество оснований в гибриде, и $[Na^{+}]$ представляет собой концентрацию ионов натрия в буфере для гибридизации ($[Na^{+}]$ для $1 \times SSC=0,165 M$). Предпочтительно, каждая такая гибридизующаяся нуклеиновая кислота имеет длину, которая составляет по меньшей мере 15 нуклеотидов (или более предпочтительно по меньшей мере 18 нуклеотидов, или по меньшей мере 20 нуклеотидов, или по меньшей мере 25 нуклеотидов, или по меньшей мере 30 нуклеотидов, или по меньшей мере 40 нуклеотидов, или наиболее предпочтительно по меньшей мере 50 нуклеотидов) или по меньшей мере 25% (более предпочтительно, по меньшей мере 50%, или по меньшей мере 60%, или по меньшей мере 70% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 80%) длины нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, с которой она гибридизуется, и характеризуется по меньшей мере 60% идентичностью последовательности (более предпочтительно, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99,5%) с нуклеиновой кислотой по настоящему изобретению, с которой она гибридизуется, где идентичность последовательности определяют путем сравнения последовательностей гибридизующихся нуклеиновых кислот, в случае если они выровнены, чтобы максимизировать перекрытие и идентичность при минимизации гэпов в последовательности, как более подробно описано выше.

[110] Варианты антигенсвязывающих белков, описанные в данном документе, могут быть получены посредством сайт-специфического мутагенеза нуклеотидов в ДНК, кодирующей полипептид, с применением касетного или ПЦР-мутагенеза или других методик, широко известных из уровня техники, для получения ДНК, кодирующей вариант, и последующей экспрессии рекомбинантной ДНК в культуре клеток, как описано в данном документе. Однако антигенсвязывающие белки, содержащие варианты CDR, имеющие не более приблизительно 100-150 остатков, можно получать путем синтеза *in vitro* с применением известных методик. Варианты обычно проявляют ту же качественную биологическую активность, что и встречающийся в природе аналог, например связывание с антигеном. Такие варианты включают, например, делеции, и/или вставки, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антигенсвязывающих белков. Для достижения конечной конструкции выполняют любую комбинацию удаления, вставки и замены при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками. Аминокислотные изменения также могут изменять посттрансляционные процессы антигенсвязывающего белка, в том числе изменение количества или положения сайтов

гликозилирования. В определенных вариантах осуществления варианты антигенсвязывающего белка получают с целью модификации тех аминокислотных остатков, которые непосредственно участвуют в связывании эпитопа. В других вариантах осуществления модификация остатков, которые непосредственно не участвуют в связывании эпитопа, или остатков, не вовлеченных каким-либо образом в связывание эпитопа, является желательной для целей, обсуждаемых в данном документе. Предполагается мутагенез в пределах любой из CDR-областей и/или каркасных областей. Специалисты в данной области техники могут использовать методики ковариационного анализа для конструирования полезных модификаций в аминокислотной последовательности антигенсвязывающего белка. См. например, Choulier, et al., *Proteins* 41:475-484, 2000; Demarest et al., *J. Mol. Biol.* 335:41-48, 2004; Hugo et al., *Protein Engineering* 16(5):381-86, 2003; Aurora et al., публикацию патента США № 2008/0318207 A1; Glaser et al., публикацию патента США № 2009/0048122 A1; Urech et al., WO 2008/110348 A1; Borrás et al., WO 2009/000099 A2. Такие модификации, определенные с помощью ковариационного анализа, могут улучшить характеристики эффективности, фармакокинетики, фармакодинамики и/или технологичности антигенсвязывающего белка.

[111] Настоящее изобретение также включает векторы, содержащие одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих один или несколько компонентов биспецифических антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению (например, переменные области, легкие цепи, тяжелые цепи, модифицированные тяжелые цепи и Fd-фрагменты). Термин "вектор" означает любую молекулу или единицу (например, нуклеиновую кислоту, плазмиду, бактериофаг или вирус), используемые для переноса кодирующей белок информации в клетку-хозяина. Примеры векторов включают без ограничения плазмиды, вирусные векторы, неэписомные векторы млекопитающих и экспрессионные векторы, например рекомбинантные экспрессионные векторы. Используемые в данном документе термины "вектор экспрессии" или "экспрессионная конструкция" относятся к молекуле рекомбинантной ДНК, содержащей требуемую кодирующую последовательность и соответствующие контрольные последовательности нуклеиновой кислоты, необходимые для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретной клетке-хозяине. Вектор экспрессии может включать без ограничения последовательности, которые влияют на транскрипцию, трансляцию или регулируют их и при наличии интронов влияют на РНК-сплайсинг кодирующей области, функционально связанной с ними. Последовательности нуклеиновых кислот, необходимые для экспрессии в прокариотах, включают промотор, необязательно последовательность оператора, сайт связывания рибосомы и, возможно, другие последовательности. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, энхансеры и сигналы терминации и полиаденилирования. Кроме того, если требуется, последовательность секреторного сигнального пептида может необязательно кодироваться вектором экспрессии, функционально связанным с представляющей интерес кодирующей последовательностью таким образом, что экспрессируемый полипептид

может секретироваться рекомбинантной клеткой-хозяином для более легкого выделения представляющего интерес полипептида из клетки. Например, в некоторых вариантах осуществления сигнальные пептидные последовательности могут быть присоединены к аминоконцу/слиты с аминоконцом любой из последовательностей полипептидов, перечисленных в таблицах 6A, 6B, 7A, 7B, 9 и 10. В определенных вариантах осуществления сигнальный пептид, имеющий аминокислотную последовательность MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC (SEQ ID NO: 32), слит с аминоконцом любой из полипептидных последовательностей из таблиц 6A, 6B, 7A, 7B, 9 и 10. В других вариантах осуществления сигнальный пептид, имеющий аминокислотную последовательность MAWALLLLTLLTQGTGSWA (SEQ ID NO: 33), слит с аминоконцом любой из полипептидных последовательностей из таблиц 6A, 6B, 7A, 7B, 9 и 10. В еще других вариантах осуществления сигнальный пептид, имеющий аминокислотную последовательность MTCSPLLLTLLHCTGSWA (SEQ ID NO: 34), слит с аминоконцом любой из полипептидных последовательностей из таблиц 6A, 6B, 7A, 7B, 9 и 10. Другие подходящие сигнальные пептидные последовательности, которые могут быть слиты с аминоконцом полипептидных последовательностей, описанных в данном документе, включают: MEAPAQLLFLLLLWLPD TTG (SEQ ID NO: 35), MEWTWRVFLVAAATGAHS (SEQ ID NO: 36), METPAQLLFLLLLWLPD TTG (SEQ ID NO: 37), METPAQLLFLLLLWLPD TTG (SEQ ID NO: 38), MKHLWFFLLLVAAPRWVLS (SEQ ID NO: 39) и MEWSWVFLFFLSVTTGVHS (SEQ ID NO: 40). Другие сигнальные пептиды известны специалистам в данной области техники и могут быть слиты с любой из полипептидных цепей, перечисленных в таблицах 6A, 6B, 7A, 7B, 9 и 10, например для облегчения или оптимизации экспрессии, в частности в клетках-хозяевах.

[112] Как правило, векторы экспрессии, используемые в клетках-хозяевах для получения биспецифических антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению, будут содержать последовательности для поддержания плазмиды и для клонирования и экспрессии экзогенных нуклеотидных последовательностей, кодирующих компоненты биспецифических антигенсвязывающих белков. Такие последовательности, обобщенно называемые "фланкирующими последовательностями", в некоторых вариантах осуществления, как правило, содержат одну или несколько из следующих нуклеотидных последовательностей: промотор, одну или несколько энхансерных последовательностей, точку начала репликации, последовательность терминации транскрипции, полную интронную последовательность, содержащую донорный и акцепторный участки сплайсинга, последовательность, кодирующую лидерную последовательность для секреции полипептида, участок связывания рибосомы, последовательность полиаденилирования, полилинкерную область для вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей предназначенный для экспрессии полипептид, и элемент селективируемого маркера. Каждая из этих последовательностей рассматривается ниже.

[113] Необязательно, вектор может содержать последовательность, кодирующую "метку", т. е., молекулу олигонуклеотида, расположенную на 5'- или 3'-конце кодирующей

последовательности полипептида; олигонуклеотидную последовательность-метку, кодирующую polyHis (такую как hexaHis) или другую "метку" такую как FLAG®, HA (гемаглютинин вируса гриппа) или mус, для которых существуют коммерчески доступные антитела. Как правило, эта метка слита с полипептидом при экспрессии полипептида, и она может служить в качестве средства для аффинной очистки или выявления полипептида из клетки-хозяина. Аффинную очистку можно осуществлять, например, с помощью колоночной хроматографии с использованием антител к метке в качестве аффинной матрицы. Необязательно, впоследствии метка может быть удалена из очищенного полипептида с помощью различных средств, таких как применение определенных пептидаз для расщепления.

[114] Фланкирующие последовательности могут быть гомологичными (т. е. принадлежать к тому же виду и/или штамму, что и клетка-хозяин), гетерологичными (т. е. принадлежать к виду, отличному от вида или штамма клетки-хозяина), гибридными (т. е. комбинация фланкирующих последовательностей из более чем одного источника), синтетическими или нативными. Следовательно, источником фланкирующей последовательности может быть любой прокариотический или эукариотический организм, любой позвоночный или беспозвоночный организм или любое растение, при условии, что фланкирующая последовательность является функциональной и может быть активирована аппаратом клетки-хозяина.

[115] Фланкирующие последовательности, применяемые в векторах по настоящему изобретению, можно получить любым из нескольких способов, хорошо известных из уровня техники. Как правило, применяемые в данном документе фланкирующие последовательности были предварительно идентифицированы с помощью картирования и/или расщепления рестрикционными эндонуклеазами, а следовательно могут быть выделены из соответствующего тканевого источника с использованием подходящих рестрикционных эндонуклеаз. В некоторых случаях может быть известна полная нуклеотидная последовательность фланкирующей последовательности. В данном случае фланкирующая последовательность может быть синтезирована с помощью стандартных способов для синтеза и клонирования нуклеиновых кислот.

[116] Вне зависимости от того, известна вся или только часть фланкирующей последовательности, ее можно получить с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или при скрининге геномной библиотеки с подходящим зондом, таким как олигонуклеотид и/или фрагмент фланкирующей последовательности из того же или другого вида. Если фланкирующая последовательность неизвестна, то фрагмент ДНК, содержащий фланкирующую последовательность, можно выделить из более крупного участка ДНК, который может содержать, например, кодирующую последовательность и даже другой ген или гены. Выделение можно осуществлять путем расщепления рестрикционными эндонуклеазами для получения надлежащего фрагмента ДНК с последующим выделением с помощью очистки в агарозном геле, колоночной хроматографии Qiagen® (Чатсворт, Калифорния, США) или других способов, известных

специалисту в данной области. Выбор подходящих ферментов для осуществления этой цели очевиден для специалиста обычной квалификации в данной области техники.

[117] Как правило, точка начала репликации является частью приобретенных на коммерческой основе прокариотических экспрессионных векторов и способствует амплификации вектора в клетке-хозяине. Если выбранный вектор не содержит точку начала репликации, то ее можно химически синтезировать на основании известной последовательности и лигировать в вектор. Например, точка начала репликации из плазмиды pBR322 (New England Biolabs, Беверли, Массачусетс, США) подходит для большинства грамотрицательных бактерий, и различные вирусные источники (например, SV40, вирус полиомы, аденовирус, вирус везикулярного стоматита (VSV) или папилломавирусы, такие как HPV или BPV) подходят для клонирования векторов в клетках млекопитающих. В целом, компонент точки начала репликации необязателен в экспрессионных векторах млекопитающих (например, точка SV40 часто используется только потому, что она также содержит ранний вирусный промотор).

[118] Как правило, последовательность терминации транскрипции расположена в 3'-направлении относительно конца кодирующей полипептид области и служит для терминации транскрипции. Обычно последовательность терминации транскрипции в прокариотических клетках представляет собой G-C-богатый фрагмент, за которым следует последовательность поли-Т. Хотя данную последовательность легко клонировать из библиотеки или даже приобрести коммерческим путем в качестве части вектора, ее также можно легко синтезировать с применением известных способов синтеза нуклеиновых кислот.

[119] Ген селективируемого маркера кодирует белок, необходимый для выживаемости и роста клетки-хозяина, растущей в селективной среде для культивирования. Типичные гены селективных маркеров кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, тетрациклину или канамицину в случае прокариотических клеток-хозяев; (b) восполняют ауксотрофный дефицит в клетке; или (c) обеспечивают необходимые питательные вещества, недоступные из комплексной или определенной среды. Конкретными селективируемыми маркерами являются ген устойчивости к канамицину, ген устойчивости к ампициллину и ген устойчивости к тетрациклину. Преимущественно, может также использоваться ген устойчивости к неомицину для селекции как в прокариотических, так и в эукариотических клетках-хозяевах.

[120] Для амплификации гена, предназначенного для экспрессии, можно использовать другие селективируемые гены. Амплификация представляет собой процесс, в котором гены, необходимые для продуцирования белка, крайне важного для роста или выживаемости клеток, повторяются последовательно в хромосомах последующих поколений рекомбинантных клеток. Примеры подходящих селективируемых маркеров для клеток млекопитающих включают дигидрофолатредуктазу (DHFR) и гены тимидинкиназы, не содержащие промоторов. Трансформанты клеток млекопитающих

помещают в условия селекционного давления, в которых только трансформанты однозначно способны к выживанию благодаря селективируемому гену, присутствующему в векторе. Давление отбора устанавливают посредством культивирования трансформированных клеток в условиях, при которых концентрация средства для отбора в среде последовательно увеличивается, приводя тем самым к амплификации как селективируемого гена, так и ДНК, которая кодирует другой ген, такой как один или несколько компонентов биспецифических антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе. В результате из амплифицированной ДНК синтезируется повышенное количество полипептида.

[121] Участок связывания рибосомы обычно необходим для инициации трансляции mRNA и характеризуется наличием последовательности Шайна-Дальгарно (прокариоты) или последовательности Kozak (эукариоты). Как правило, этот элемент расположен в направлении 3'-конца относительно промотора и в 5'-конца относительно кодирующей последовательности полипептида, предназначенного для экспрессии. В определенных вариантах осуществления одна или несколько кодирующих областей могут быть функционально связаны с внутренним сайтом связывания рибосом (IRES), что дает возможность переносить две открытые рамки считывания из единичного транскрипта РНК.

[122] В некоторых случаях, например, в случае если в системе экспрессии эукариотической клетки-хозяина требуется гликозилирование, можно манипулировать с разными пре- или пропоследовательностями для улучшения состояния гликозилирования или выхода. Например, можно изменять участок расщепления пептидазами конкретного сигнального пептида или добавлять пропоследовательности, которые также могут влиять на гликозилирование. Конечный белковый продукт может содержать в положении -1 (по отношению к первой аминокислоте зрелого белка) одну или несколько дополнительных аминокислот, связанных с экспрессией, которые могли быть не полностью удалены. Например, конечный белковый продукт может содержать один или несколько аминокислотных остатков, находящихся в сайте расщепления пептидазами, присоединенных к амино-концу. Как альтернатива, применение некоторых сайтов расщепления может приводить к слегка укороченной форме требуемого полипептида, если фермент делает надрез в такой области зрелого полипептида.

[123] Векторы экспрессии и клонирования по настоящему изобретению обычно содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с молекулой, кодирующей полипептид. Используемый в данном документе термин "функционально связанный" относится к связыванию двух или больше последовательностей нуклеиновой кислоты таким образом, что получается молекула нуклеиновой кислоты, способная направлять транскрипцию данного гена и/или синтез требуемой молекулы белка. Например, регуляторная последовательность в векторе, которая "функционально связана" с кодирующей белок последовательностью, лигирована таким образом, что экспрессия кодирующей белок последовательности достигается в

условиях, совместимых с транскрипционной активностью регуляторных последовательностей. Более конкретно, последовательность промотора и/или энхансера, в том числе любая комбинация цис-действующих элементов контроля транскрипции, функционально связана с кодирующей последовательностью, если она стимулирует или модулирует транскрипцию кодирующей последовательности в соответствующей клетке-хозяине или другой системе экспрессии.

[124] Промоторы представляют собой нетранскрибируемые последовательности, расположенные выше (т. е. в 5'-направлении) стартового кодона структурного гена (как правило, в пределах приблизительно 100-1000 п. о.), которые регулируют транскрипцию структурного гена. Традиционно промоторы подразделяют на два класса: индуцибельные промоторы и конститутивные промоторы. Индуцибельные промоторы инициируют повышенные уровни транскрипции из ДНК, находящейся под их управлением, в ответ на некоторые изменения в культуральных условиях, такие как присутствие или отсутствие питательных веществ или изменение температуры. С другой стороны, конститутивные промоторы равномерно транскрибируют ген, с которым они функционально связаны, т. е. происходит незначительный контроль экспрессии гена или он отсутствует. Хорошо известно большое число промоторов, распознаваемых различными потенциальными клетками-хозяевами. Подходящий промотор функционально связан с ДНК, кодирующей, например, тяжелую цепь, легкую цепь, модифицированную тяжелую цепь или другой компонент биспецифических антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению, посредством удаления промотора из исходной ДНК посредством расщепления рестрикционным ферментом и вставки требуемой последовательности промотора в вектор.

[125] Также из уровня техники хорошо известны промоторы, подходящие для применения с дрожжевыми хозяевами. Дрожжевые энхансеры предпочтительно используют с дрожжевыми промоторами. Подходящие промоторы для применения с клетками-хозяевами млекопитающих хорошо известны и включают без ограничения промоторы, полученные из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы кур, аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирусы, вирус гепатита В и наиболее предпочтительно вирус обезьян 40 (SV40). Другие подходящие промоторы млекопитающих включают гетерологичные промоторы млекопитающих, например, промоторы теплового шока и промотор актина.

[126] Дополнительные промоторы, которые могут представлять интерес, включают без ограничения: ранний промотор SV40 (Benoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310); промотор CMV (Thornsen et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 81:659-663); промотор, содержащийся в 3'-концевом длинном повторе вируса саркомы Рауса (Yamamoto et al., 1980, *Cell* 22:787-797); промотор тимидинкиназы вируса герпеса (Wagner et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 1444-1445); промоторные и регуляторные последовательности из гена металлотинина, Prinster et al., 1982, *Nature* 296:39-42), и прокариотические

промоторы, такие как промотор бета-лактамазы (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731) или промотор tac (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25). Также представляют интерес следующие транскрипционные регуляторные области животных, которые демонстрируют тканевую специфичность и применялись в трансгенных животных: регуляторная область гена эластазы I, активная в панкреатических ацинарных клетках (Swift et al., 1984, Cell 38:639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); регуляторная область гена инсулина, которая активна в бета-клетках поджелудочной железы (Hanahan, 1985, Nature 315: 115-122); регуляторная область гена иммуноглобулина, которая активна в лимфоидных клетках (Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658; Adames et al., 1985, Nature 318:533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 1436-1444); регуляторная область вируса опухоли молочной железы мыши, которая активна в клетках яичка, молочной железы, лимфоидных и тучных клетках (Leder et al., 1986, Cell 45:485-495); регуляторная область гена альбумина, которая активна в печени (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-276); регуляторная область гена альфа-фетопротеина, которая активна в печени (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5: 1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 253:53-58); регуляторная область гена альфа-1-антитрипсина, которая активна в печени (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1: 161-171); регуляторная область гена бета-глобина, которая активна в миелоидных клетках (Mogam et al., 1985, Nature 315:338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94); регуляторная область гена основного белка миелина, которая активна в олигодендроцитах в головном мозге (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712); регуляторная область гена легкой цепи 2 миозина, которая активна в скелетных мышцах (Sani, 1985, Nature 314:283-286); и регуляторная область гена гонадотропного рилизинг-гормона, которая активна в гипоталамусе (Mason et al., 1986, Science 234: 1372-1378).

[127] Последовательность энхансера может быть вставлена в вектор для повышения транскрипции ДНК, кодирующей компонент биспецифических антигенсвязывающих белков (например, легкой цепи, тяжелой цепи, модифицированной тяжелой цепи, Fd-фрагмента), у высших эукариот. Энхансеры представляют собой цис-действующие элементы ДНК длиной обычно приблизительно 10-300 п. о., которые воздействуют на промотор для повышения транскрипции. Энхансеры являются относительно ориентационно и позиционно независимыми и могут находиться в положениях как 5', так и 3' по отношению к транскрипционной единице. Известно несколько энхансерных последовательностей, доступных из генов млекопитающих (например, глобин, эластаза, альбумин, альфа-фетопротеин и инсулин). При этом, как правило, используют энхансеры из вирусов. Известные из уровня техники энхансер SV40, энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы и энхансер аденовируса представляют собой типовые энхансерные элементы для активации эукариотических промоторов. Хотя энхансер может находиться в векторе как с 5'-, так и с 3'-конца по отношению к кодирующей последовательности, как правило, он расположен с

5'-конца от промотора. Последовательность, кодирующая соответствующую нативную или гетерологичную сигнальную последовательность (лидерную последовательность или сигнальный пептид), может быть встроена в вектор экспрессии для стимуляции внеклеточной секреции антитела. Выбор сигнального пептида или лидерной последовательности зависит от типа клеток-хозяев, в которых должно продуцироваться антитело, и гетерологичная сигнальная последовательность может замещать нативную сигнальную последовательность. Примеры сигнальных пептидов описаны выше. Другие сигнальные пептиды, которые являются функциональными в клетках-хозяевах млекопитающих, включают следующее: сигнальную последовательность интерлейкина-7 (IL-7), описанную в патенте США № 4965195; сигнальную последовательность рецептора интерлейкина-2, описанную в публикации Cosman et al., 1984, Nature 312:768; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-4, описанный в европейском патенте № 0367566; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-1 типа I, описанный в патенте США № 4968607; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-1 типа II, описанный в европейском патенте № 0460846.

[128] Предусмотренные векторы экспрессии могут быть сконструированы из исходного вектора, такого как коммерчески доступный вектор. Такие векторы могут содержать все необходимые фланкирующие последовательности или не содержать их. Если одна или несколько из описанных в данном документе фланкирующих последовательностей изначально не присутствует в векторе, то их можно получить отдельно и лигировать в вектор. Способы, применяемые для получения каждой из фланкирующих последовательностей, хорошо известны специалисту в данной области техники. Векторы экспрессии могут быть введены в клетки-хозяева, чтобы тем самым получать белки, в том числе слитые белки, кодируемые нуклеиновыми кислотами, как описано в данном документе.

[129] В определенных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие различные компоненты биспецифических антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению, могут быть вставлены в один и тот же вектор экспрессии. В таких вариантах осуществления две нуклеиновые кислоты могут быть разделены участком внутренней посадки рибосомы (IRES) и под контролем одного промотора таким образом, что легкая цепь и тяжелая цепь экспрессируются из одного и того же транскрипта mRNA. Как альтернатива, две нуклеиновые кислоты могут находиться под контролем двух отдельных промоторов таким образом, что легкая цепь и тяжелая цепь экспрессируются из двух отдельных транскриптов mRNA.

[130] Аналогично, в случае биспецифических антигенсвязывающих белков IgG-scFv нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь, можно клонировать в тот же вектор экспрессии, где находится и нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированную тяжелую цепь (слитый белок, содержащий тяжелую цепь и scFv), при этом две нуклеиновые кислоты находятся под контролем одного промотора и разделены посредством IRES, или две нуклеиновые кислоты находятся под контролем двух

отдельных промоторов. В случае биспецифических антигенсвязывающих белков IgG-Fab нуклеиновые кислоты, кодирующие каждый из трех компонентов, можно клонировать в один и тот же вектор экспрессии. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая легкую цепь молекулы IgG-Fab, и нуклеиновая кислота, кодирующая второй полипептид (который содержит другую половину С-концевого домена Fab), клонируются в один вектор экспрессии, тогда как нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированную тяжелую цепь (слитый белок, содержащий тяжелую цепь и половину домена Fab), клонируется во второй вектор экспрессии. В определенных вариантах осуществления все компоненты биспецифических антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе, экспрессируются в одной и той же популяции клеток-хозяев. Например, даже если один или несколько компонентов клонировать в отдельный вектор экспрессии, клетка-хозяин совместно трансфицируется обоими векторами экспрессии таким образом, что одна клетка продуцирует все компоненты биспецифических антигенсвязывающих белков.

[131] После того как вектор был сконструирован, и одна или несколько молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих компоненты биспецифических антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе, были вставлены в соответствующий(соответствующие) сайт(сайты) вектора или векторов, готовый(готовые) вектор(векторы) может(могут) быть вставлен(вставлены) в подходящую клетку-хозяина для амплификации и/или экспрессии полипептида. Таким образом, настоящее изобретение охватывает выделенную клетку-хозяина, содержащую один или несколько векторов экспрессии, кодирующих компоненты биспецифических антигенсвязывающих белков. Используемый в данном документе термин "клетка-хозяин" относится к клетке, которая была трансформирована или способна трансформироваться нуклеиновой кислотой и тем самым экспрессирует представляющий интерес ген. Данный термин включает в себя потомство исходной клетки вне зависимости от того, идентично или нет это потомство по морфологии или по генетической конструкции исходной родительской клеткой, до тех пор, пока присутствует представляющий интерес ген. Клетка-хозяин, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, предпочтительно функционально связанную с по меньшей мере одной последовательностью контроля экспрессии (например, промотором или энхансером), представляет собой "рекомбинантную клетку-хозяин".

[132] Трансформация вектора экспрессии для антигенсвязывающего белка в выбранную клетку-хозяин может быть выполнена с помощью хорошо известных способов, в том числе трансфекции, инфекции, совместного осаждения фосфатом кальция, электропорации, микроинъекции, липофекции, трансфекции, опосредованной DEAE-декстраном, или других известных методик. Выбранный способ частично будет зависеть от используемого типа клетки-хозяина. Данные способы и другие подходящие способы широко известны специалисту в данной области техники и изложены, например, в Sambrook et al., 2001, выше.

[133] При культивировании в подходящих условиях клетка-хозяин синтезирует антигенсвязывающий белок, который впоследствии может быть собран из культуральной среды (если клетка-хозяин секретирует его в среду) или непосредственно из клетки-хозяина, продуцирующей его (если оно не секретируется). Выбор подходящей клетки-хозяина будет зависеть от различных факторов, таких как требуемые уровни экспрессии, полипептидные модификации, желательные или необходимые для активности (такие как гликозилирование или фосфорилирование), и легкость сворачивания в биологически активную молекулу.

[134] Типичные клетки-хозяева включают прокариотические, дрожжевые или высшие эукариотические клетки. Прокариотические клетки-хозяева включают эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например, Enterobacteriaceae такие как *Escherichia*, например, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, например, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, например, *Serratia marcescans* и *Shigella*, а также *Bacillus*, например, *B. subtilis* и *B. licheniformis*, *Pseudomonas* и *Streptomyces*. Эукариотические микробы, такие как нитчатые грибы или дрожжи, являются подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии рекомбинантных полипептидов. *Saccharomyces cerevisiae* или обыкновенные пекарские дрожжи наиболее часто применяются среди низших эукариотических микроорганизмов-хозяев. Однако несколько других родов, видов и штаммов являются общедоступными и применимыми в данном документе, например, такие как *Pichia*, например, *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces*, *Yarrowia*; *Candida*; *Trichoderma reesia*; *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, например *Schwanniomyces occidentalis*; и нитчатые грибы, такие как, например, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyocladium* и хозяева *Aspergillus*, такие как *A. nidulans* и *A. niger*.

[135] Клетки-хозяева для экспрессии гликозилированных антигенсвязывающих белков могут быть получены из многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Были идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы и варианты и соответствующие пермиссивные клетки-хозяева насекомых из таких хозяев, как *Spodoptera frugiperda* (гусеница), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (фруктовая муха) и *Bombyx mori*. Общедоступно множество вирусных штаммов для трансфекции таких клеток, например, вариант L-1 *Autographa californica* NPV и штамм Bm-5 *Bombyx mori* NPV.

[136] Клетки-хозяева позвоночных также являются подходящими хозяевами, и рекомбинантное получение антигенсвязывающих белков из таких клеток стало обычной процедурой. Линии клеток млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны из уровня техники и включают без ограничения иммортализованные линии клеток, доступные из Американской коллекции типовых культур (АТСС), включая без ограничения клетки яичника китайского хомячка (СНО), включая клетки линии СНОК1 (АТСС CCL61), DXB-11, DG-44 и клетки яичника китайского хомячка/-DHFR

(CHO, Urlaub et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216, 1980); линия CV1 почки обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); эмбриональная почечная линия человека (клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре (Graham et al, J. Gen Virol. 36: 59, 1977); клетки почки детеныша хомяка (BHK, ATCC CCL 10); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251, 1980); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крысы линии buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75); клетки гепатомы человека (Hep G2, HB 8065); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68, 1982); клетки MRC 5 или клетки FS4; клетки миеломы млекопитающих и несколько других клеточных линий. В другом варианте осуществления может быть выбрана клеточная линия из В-лимфоцитарной линии дифференцировки, которая не продуцирует свое собственное антитело, но обладает способностью продуцировать и секретировать гетерологичное антитело. Клетки CHO являются предпочтительными клетками-хозяевами в некоторых вариантах осуществления для экспрессии биспецифических антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению.

[137] Клетки-хозяева трансформируют или трансфицируют с помощью описанных выше нуклеиновых кислот или векторов для получения биспецифических антигенсвязывающих белков и культивируют в общепринятых питательных средах, модифицированных в соответствии с необходимостью индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих требуемые последовательности. Кроме того, новые векторы и трансфицированные клеточные линии с несколькими копиями транскрипционных единиц, разделенных селективным маркером, особенно полезны для экспрессии антигенсвязывающих белков. Таким образом, настоящее изобретение также предусматривает способ получения биспецифического антигенсвязывающего белка, описанного в данном документе, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей один или несколько векторов экспрессии, описанных в данном документе, в культуральной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию биспецифического антигенсвязывающего белка, кодируемого одним или несколькими векторами экспрессии, и выделение биспецифического антигенсвязывающего белка из культуральной среды.

[138] Клетки-хозяева, применяемые для получения антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению, можно культивировать в различных средах. Коммерчески доступные среды, такие как Ham's F10 (Sigma), минимальная питательная среда ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и модифицированная по Дульбекко среда Игла ((DMEM), Sigma), подходят для культивирования клеток-хозяев. Кроме того, любая из сред, описанных в Ham et al., Meth. Enz. 58: 44, 1979; Barnes et al., Anal. Biochem. 102: 255, 1980; патентах США №№ 4767704; 4657866; 4927762; 4560655; или 5122469; WO90103430; WO

87/00195; или патенте США № RE30985, может быть использована как культуральная среда для клеток-хозяев. Любую из этих сред можно, при необходимости, дополнить гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальций, магний и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как Gentamycin™ лекарственное средство), микроэлементами (определяемыми как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Любые другие необходимые добавки также могут быть включены в соответствующих концентрациях, которые должны быть известны специалистам в данной области техники. Условия культивирования, такие как температура, pH и т. п. являются такими, которые ранее применялись для клетки-хозяина, выбранной для экспрессии, и будут очевидны специалисту в данной области техники.

[139] В ходе культивирования клеток-хозяев биспецифический антигенсвязывающий белок можно получать внутриклеточно, в периплазматическом пространстве, или он может секретироваться непосредственно в среду. Если антигенсвязывающий белок продуцируется внутриклеточно, то в качестве первой стадии удаляют твердые остатки, либо клетки-хозяева, либо лизированные фрагменты, например путем центрифугирования или ультрафильтрации. Биспецифический антигенсвязывающий белок можно очищать с применением, например, гидроксиапатитной хроматографии, катионо- или анионообменной хроматографии или предпочтительно аффинной хроматографии с применением представляющего(представляющих) интерес антигена(антигенов) или белка А или белка G в качестве аффинного лиганда. Белок А можно использовать для очистки белков, которые содержат полипептиды на основе тяжелых цепей $\gamma 1$, $\gamma 2$ или $\gamma 4$ человека (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62: 1-13, 1983). Белок G рекомендуется для всех мышинных изоформ и для $\gamma 3$ человека (Guss et al., EMBO J. 5: 15671575, 1986). Матрица, к которой присоединяется аффинный лиганд, наиболее часто является агарозой, но также доступны другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемым размером пор или поли(стиролдивинил)бензол, обеспечивают более высокие скорости потока и меньшее время обработки, чем те, которые достигаются при использовании агарозы. В случае если белок содержит домен СНЗ, для очистки можно применять смолу Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.). Другие методики очистки белков, такие как осаждение этанолом, обращенно-фазовая HPLC, хроматофокусирование, SDS-PAGE и осаждение сульфатом аммония также возможны в зависимости от конкретного биспецифического антигенсвязывающего белка, который необходимо выделить.

[140] Примеры

[141] CHZ01

[142] Возможность получения полиспецифических антигенсвязывающих белков и

терапевтических белков с увеличенным периодом полужизни имеет первостепенное значение для усовершенствования многих кандидатных терапевтических средств с целью внедрения в клиническую практику. Часто это подразумевает обширное конструирование белка с разными степенями успеха. В любом случае две различные Fc-части объединяются и образуют гетеродимер. Для этого должны произойти изменения в нативной последовательности белка. Традиционно данные изменения были сфокусированы на поверхности взаимодействия СНЗ-СНЗ' Fc-части, куда были вставлены мутации с заменой пар заряженных аминокислот и конструкции типа выступ в углубление.

[143] Можно видеть, что две тяжелые цепи в моноклональном антителе имеют две основные точки контакта: Fc-СНЗ и шарнир (ФИГ. 1). Шарнирная область соединяет Fc с двумя доменами Fab, и, следовательно, она должна иметь гибкую структуру, которая допускает свободное вращение Fab, что необходимо для этих основных частей для принятия правильного угла подхода с целью взаимодействия со своими мишенями, в то время как Fc-область может взаимодействовать с ее многочисленными партнерами по связыванию, такими как FcγR, FcRn и C1q. Несмотря на гибкость вокруг шарнирной области, данная поверхность взаимодействия опосредована сильным и структурно жестким мотивом, мотивом "СРРС" (ФИГ. 1-3). В данном случае остатки пролина приводят к образованию очень специфической и стабильной вторичной структуры, которая позволяет боковым цепям с группами -SH при остатках цистеина взаимодействовать с их партнерами и образовывать дисульфидные связи. Более того, этот же жесткий каркас, вероятно, будет простираться выше и ниже мотива "СРР", что позволяет предположить, что боковые цепи этих остатков вблизи данного мотива также вероятно присутствуют в стабильной конформации.

[144] Единственная кристаллическая структура человеческого полноразмерного антитела IgG1, доступная в Protein Data Bank ("PDB") (1HZH PDB), демонстрирует лишь частично интактный мотив СРРС, где второй цистеин (С242) не образует дисульфидную связь, при этом каждая боковая цепь в положении 242 в двух цепях полипептидов ориентирована в противоположном направлении (ФИГ. 2). Несмотря на то, что имеется информация о структуре для мышинового антитела IgG1, демонстрирующего интактную структуру мотива СРРС, отличие последовательностей у этих двух видов (ФИГ. 3) не позволяло точно спрогнозировать пространственное расположение боковых цепей этих остатков ниже Cys 242 в человеческом IgG1. Поэтому и с сохранением нативной последовательности мотива СРРС цепь противоположно заряженных остатков, названную "шарнир с заряженной застежкой-молнией 01" (СZH01), вставляли ниже той же области (ФИГ. 4). Считается, что эта "заряженная застежка-молния" будет как притягивать тяжелые цепи с противоположным зарядом, так и отталкивать цепи с одинаковым зарядом.

[145] Для того, чтобы протестировать данную гипотезу, эти мутации вставляли в антитело X и временно экспрессировали в клетках НЕК293 с последующей

одностадийной очисткой белка (с применением белка А с последующей СЕХ). Для проверки, состоят ли новополученные антитела из двух разных тяжелых цепей (отрицательно и положительно заряженных соответственно), проводили обширные масс-спектрометрические анализы в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Действительно, результаты демонстрировали, что данная стратегия позволяла успешно управлять образованием пар тяжелых цепей без введения каких-либо дополнительных мутаций в область Fc-СН3 (ФИГ. 4-6). Наиболее вероятно, что цепь лизинов (243-247) сталкивается и взаимодействует с цепью аспарагиновых кислот (243-247).

[146] СНЗ11

[147] Кроме того, результаты структурного анализа молекулы мышинового IgG2 демонстрируют, что остатки 246 и 247 в одной цепи и остаток 244 в противоположной цепи содержат боковые цепи, направленные друг к другу (ФИГ. 9). Данные остатки расположены ниже Cys242 и в непосредственной близости к мотиву СРРС, что свидетельствует о конформационной стабильности. Более того, заряженные остатки содержат боковые цепи, которые могут соответствовать структурному пространственному расположению и, таким образом, не нарушать поверхность взаимодействия СРРС. Как Asn246, так и Leu247 заменяли на отрицательно заряженные остатки аспарагиновой кислоты. Для образования пары с данными двумя остатками одним гистидином заменяли Ala244 в противоположной цепи таким образом, чтобы он мог либо устанавливать продуктивные контакты с противоположно заряженными остатками (Asp246 и Asp247), либо проявлять отталкивающий эффект (ФИГ. 9 и 10) (СЗН11). Чтобы протестировать данную рациональную конструкцию данный вариант экспрессировали и очищали. Посредством масс-спектрометрии было подтверждено, что, данных трех остатков, образующих триаду, действительно было достаточно для управления димеризацией шарнира (ФИГ. 10).

[148] СНЗ09

[149] Затем тестировали вышележащую область СРРС-области для проверки, можно ли посредством конструирования данной последовательности также управлять димеризацией тяжелых цепей. При сохранении двух мутаций с заменой пар заряженных аминокислот Ala244Lys/Asp и Glu246Lys/Asp ниже остатка Cys242 вставляли две дополнительные мутации с заменой пар заряженных аминокислот His237Lys/Asp и Thr246Lys/Asp выше остатка Cys239 (СЗН09) (ФИГ. 7). Данные демонстрируют, что СРМ, вставленные выше мотива СРРС, также способны управлять димеризацией тяжелых цепей.

[150] СРМ в СНЗ

[151] Кроме того, СРМ (мутации с заменой пар заряженных аминокислот), вставленные в шарнирную область, совместимы с СРМ, ранее вставленными в области Fc-СН3. Так называемые СРМ в СНЗ 'v11' (D399K в одной области СНЗ и K409D/K392D в другой области СНЗ) добавляли в молекулы, содержащие мутации СЗН01, СЗН09 и СЗН11 (ФИГ. 11 и 12). Результаты демонстрировали, что все три СРМ, вставленные в

шарнирную область, CZH01, CZH09 и CZH11, также могли успешно управлять образованием пар тяжелых цепей в присутствии CPM в Fc-CH3.

[152] Для оценки влияния этих новых мутаций, сконструированных в ходе анализов оценки стабильности шарнирной области, проводили определение значений термостабильности данных новых вариантов по сравнению с молекулой дикого типа. Данные демонстрируют, что данные по Tm для CZH01, CZH09 и CZH11 очень хорошо сопоставимы с контролем CHZ00 в отсутствие CH3-CPM v11 (73,3°C) и с CHZ00 в присутствии CH3-CPM v11 (70,7°C) (таблица 1).

[153] Таблица 1.

Молекула	Мутация в шарнире	+ CPM в CH3 v11	Tm1 (°C)	Tagg (°C)
Стандартное антитело IgG	CHZ00 (WT)	N	73,3	68,9
Стандартное антитело IgG	CHZ01	N	73,4	73,8
Стандартное антитело IgG	CHZ09	N	73,7	75,5
Стандартное антитело IgG	CHZ11	N	73,2	74,4
Стандартное антитело IgG	CHZ00 (WT)	Y	70,7	73,6
Стандартное антитело IgG	CHZ01	Y	71,9	74,2
Стандартное антитело IgG	CHZ09	Y	69,8	74,3
Стандартное антитело IgG	CHZ11	Y	69,6	73,6

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный гетеромультимер, содержащий шарнирный домен гетеродимерного иммуноглобулина, содержащий первый полипептид шарнирного домена иммуноглобулина и второй полипептид шарнирного домена иммуноглобулина, где:

(i) первый полипептид шарнирного домена иммуноглобулина содержит следующие аминокислотные замены: P243K, A244K, P245K, N/E246K и L247K, и

(ii) второй полипептид шарнирного домена иммуноглобулина содержит следующие аминокислотные замены: P243D, A244D, P245D, N/E246D и L247D;

где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, изложенному согласно Kabat.

2. Выделенный гетеромультимер по п. 1, где каждый полипептид шарнирного домена дополнительно содержит замену L248C.

3. Выделенный гетеромультимер, содержащий шарнирный домен гетеродимерного иммуноглобулина, содержащий первый полипептид шарнирного домена иммуноглобулина и второй полипептид шарнирного домена иммуноглобулина, где:

(i) первый полипептид шарнирного домена иммуноглобулина содержит следующую аминокислотную замену: A244H, и

(ii) второй полипептид шарнирного домена иммуноглобулина содержит следующие аминокислотные замены: N/E246D и L247D;

где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, изложенному согласно Kabat.

4. Выделенный гетеромультимер по п. 3, где каждый полипептид шарнирного домена дополнительно содержит замену L248C.

5. Выделенный гетеромультимер, содержащий шарнирный домен гетеродимерного иммуноглобулина, содержащий первый полипептид шарнирного домена иммуноглобулина и второй полипептид шарнирного домена иммуноглобулина, где:

(i) первый полипептид шарнирного домена иммуноглобулина содержит следующие аминокислотные замены: H237K, T238K, A244K и N/E246K, и

(ii) второй полипептид шарнирного домена иммуноглобулина содержит следующие аминокислотные замены: H237D, T238D, A244D и N/E246D;

где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, изложенному согласно Kabat.

6. Выделенный гетеромультимер по п. 5, где каждый полипептид шарнирного домена дополнительно содержит замену L248C.

7. Выделенный гетеромультимер по любому из предыдущих пунктов, где каждый полипептид шарнирного домена иммуноглобулина дополнительно содержит домен CH3.

8. Выделенный гетеромультимер по п. 7, где один домен CH3 содержит мутацию F405L, F405A, F405D, F405E, F405H, F405I, F405K, F405M, F405N, F405Q, F405S, F405T, F405V, F405W или F405Y, а другой домен CH3 содержит мутацию K409R; где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, изложенному согласно Kabat.

9. Выделенный гетеромультимер по п. 7, где один домен СН3 содержит мутацию Т366W, а другой домен СН3 содержит мутации Т366S, L368A, Y407V; где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, изложенному согласно Kabat.

10. Выделенный гетеромультимер по п. 7, где один домен СН3 содержит мутации К/R409D и К392D, а другой домен СН3 содержит мутации D399K и E356K; где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, изложенному согласно Kabat.

11. Выделенный гетеромультимер по любому из пп. 8-10, где один домен СН3 содержит мутацию Y349C, а другой домен СН3 содержит мутацию E356C или S354C; где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, изложенному согласно Kabat.

12. Выделенный гетеромультимер по п. 7, где один домен СН3 содержит мутации Y349C и Т366W, а другой домен СН3 содержит мутации E356C, Т366S, L368A и Y407V; где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, изложенному согласно Kabat.

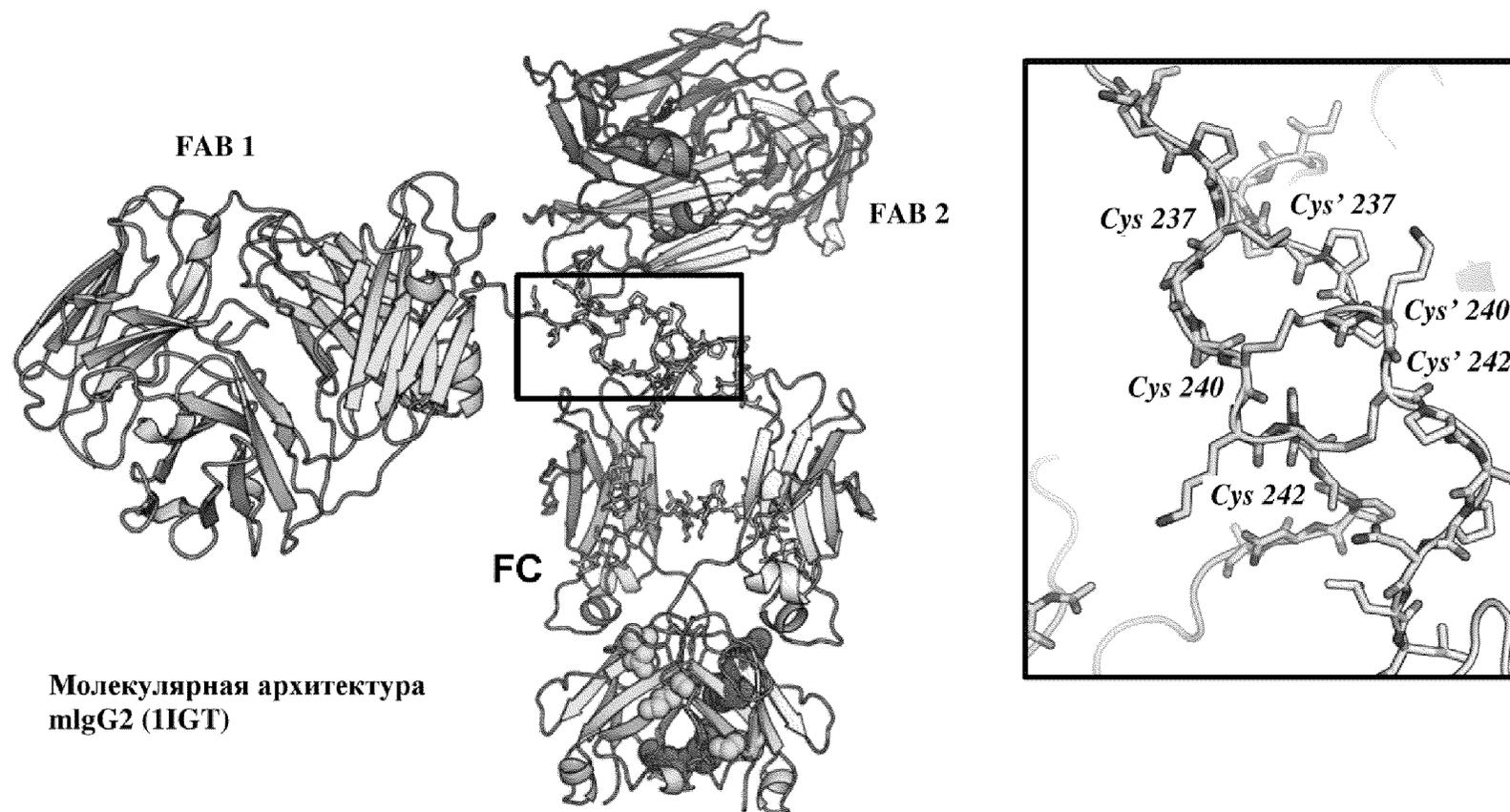
13. Выделенный гетеромультимер по п. 7, где один домен СН3 содержит мутации Y349C и Т366W, а другой домен СН3 содержит мутации S354C, Т366S, L368A, Y407V; где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу, изложенному согласно Kabat.

14. Выделенный гетеромультимер по любому из предыдущих пунктов, где шарнирная область иммуноглобулина представляет собой шарнирную область IgG1.

15. Выделенный гетеромультимер по любому из предыдущих пунктов, где гетеромультимер представляет собой биспецифическое или полиспецифическое антитело.

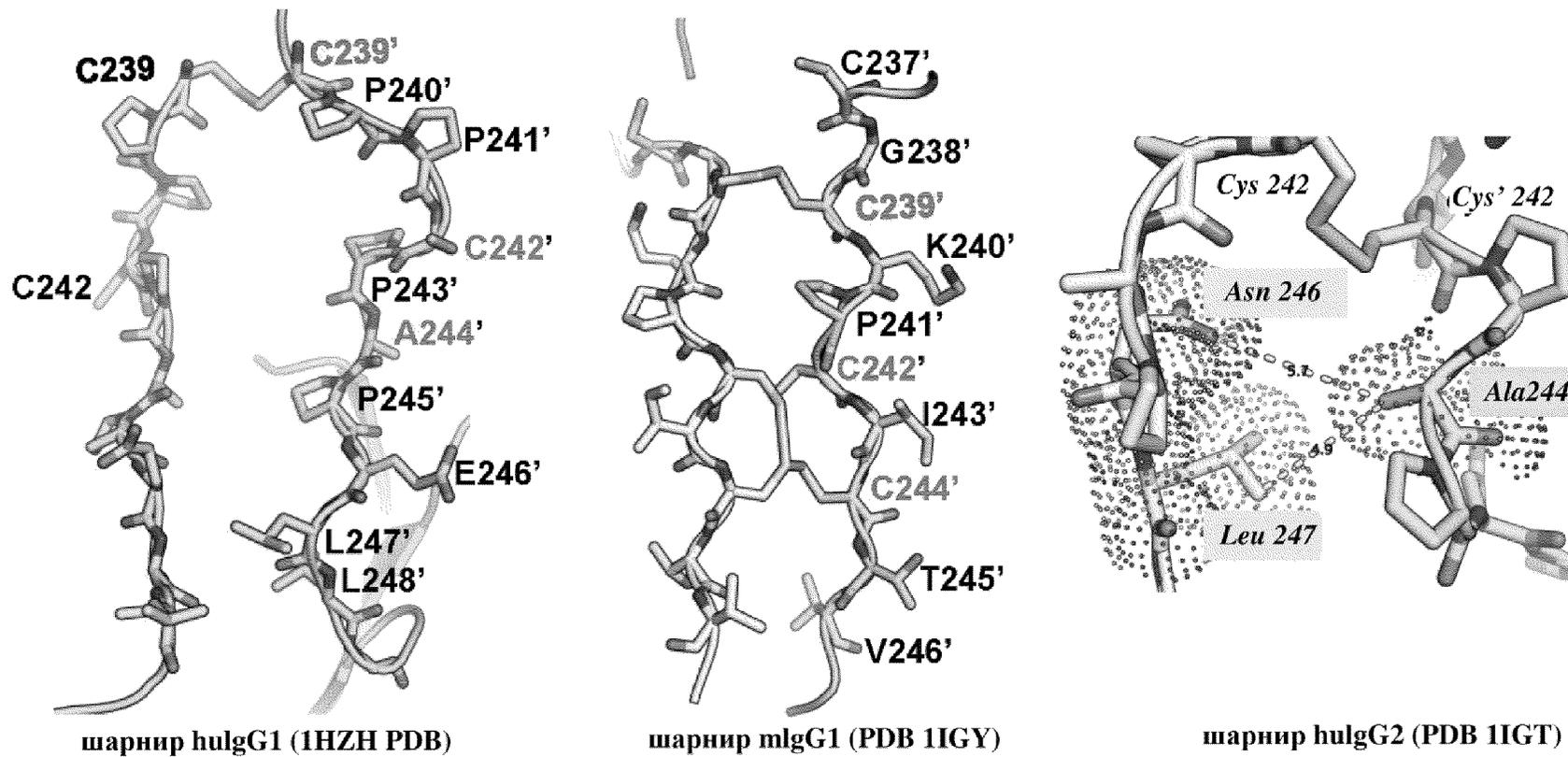
По доверенности

НАЦЕЛИВАНИЕ НА ШАРНИРНУЮ ОБЛАСТЬ С ОБРАЗОВАНИЕМ ГЕТЕРОДИМЕРОВ



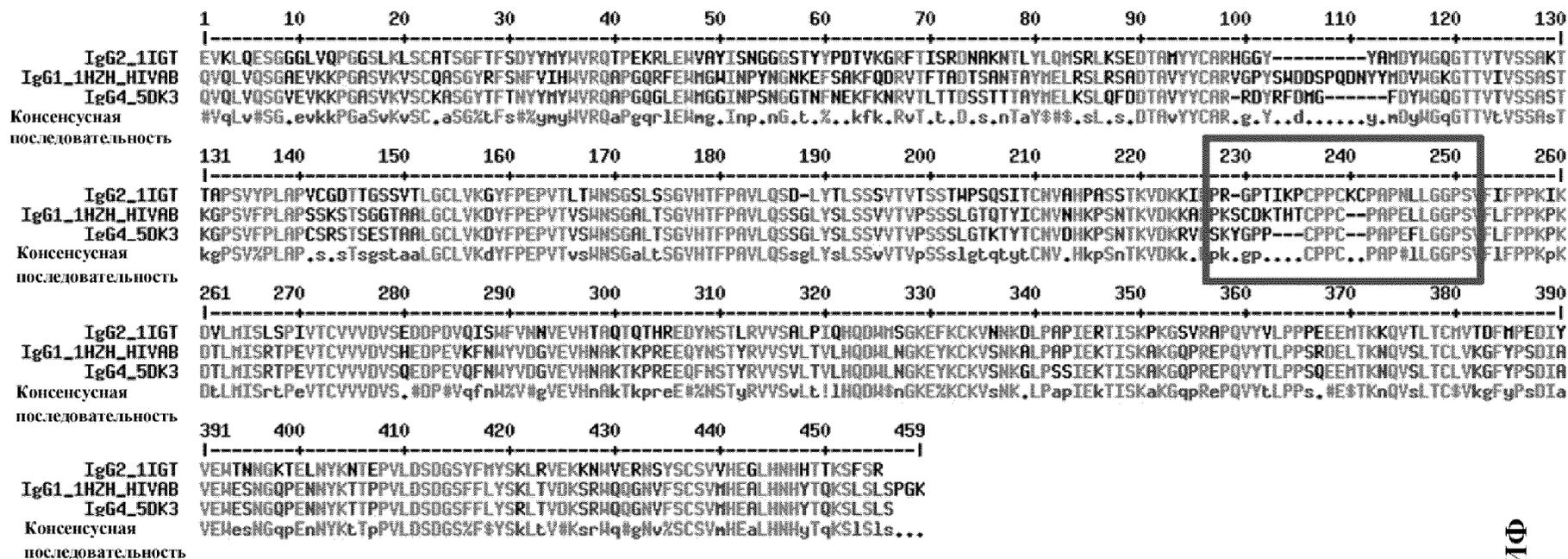
ФИГ. 1

КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО IGG1



ФИГ. 2

ВЫРАВНИВАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ IGG1, IGG2 И IGG4



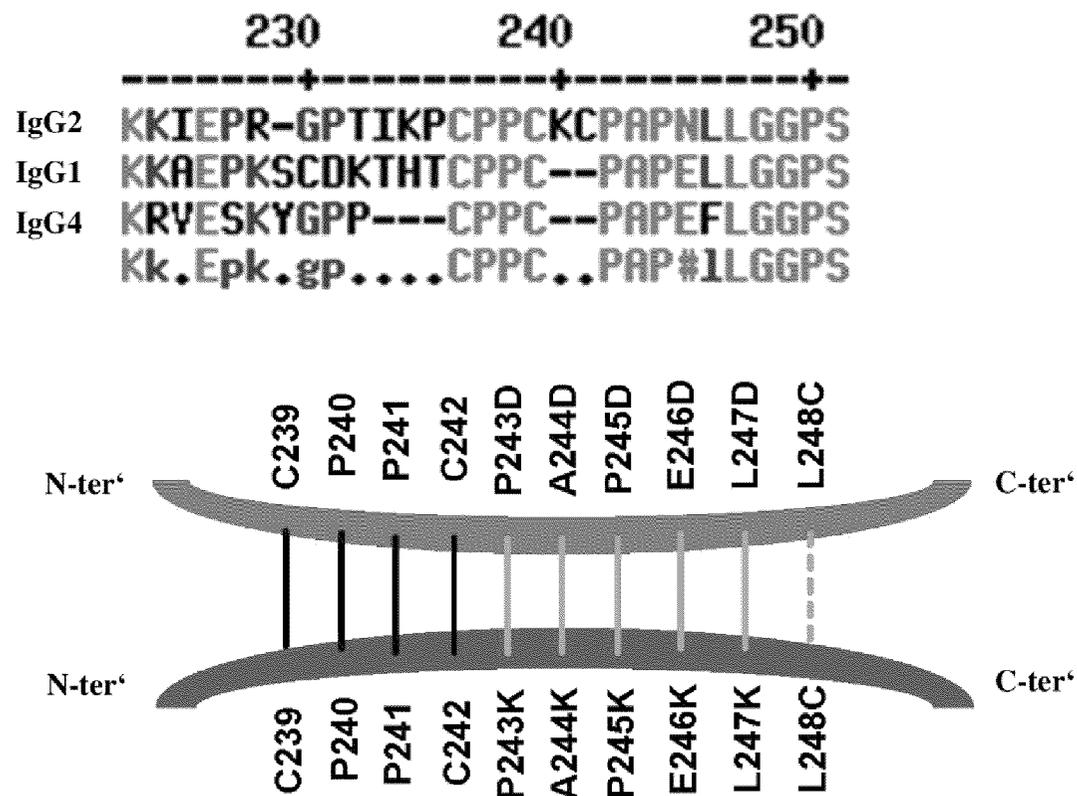
ФИГ. 3

СВОДНАЯ ТАБЛИЦА: КОНСТРУКЦИИ ШАРНИРОВ

Партии белков	Идентичность последовательностей белков	ID BioReg	ID сбора	Титр	Размер партии (мг)	ID конструкции	Конструкция	MSQC	Комментарии	Измеренная масса (Да)	Ожидаемая масса (Да)	Ошибка (Да)	P.I.	СІЕХ
PL-55656	iPS:105287	5278	HV-75326	15 мг/л	1	CHZ00	HC - THTCPRCPAPELL HC' - THTCPRCPAPELL	пройдена	Контроль	145079	145081	-2	8,71	один пик
PL-55657	iPS:572023	5279	HV-75327	8 мг/л	0,45	CHZ01	HC - THTCPRCDDDDDC HC' - THTCPRCKKKKCC	пройдена		145259	145260	-1	8,98	множественные пики
PL-55658	iPS:572024	5280	HV-75328	6 мг/л	0,45	CHZ02	HC - THTCPRCPDDDDC HC' - THTCPRCPKPKKCC	не пройдена	2 + HC**	145255	145211	44	8,98	
PL-55659	iPS:572025	5281	HV-75329	9 мг/л	0,57	CHZ03	HC - THTCPRCPDPDDC HC' - THTCPRCPKPKKCC	не пройдена	2 + HC	145197	145162	35	8,98	
PL-55660	iPS:572027	5282	HV-75330	9 мг/л	0,58	CHZ04	HC - THTCPRCPDPDLC HC' - THTCPRCPKPKLCC	не пройдена	2 + HC	145167	145145	22	8,99	
PL-55661	iPS:572029	5283	HV-75331	11 мг/л	0,87	CHZ05	HC - THTCPRCPDPDLL HC' - THTCPRCPKPKLL	не пройдена	2 + HC	145191	145167	24	8,99	
PL-55662	iPS:572031	5284	HV-75332	13 мг/л	1,18	CHZ06	HC - THTCPRCPDPPELL HC' - THTCPRCPKPLLL	не пройдена	2 + HC	145196	145182	14	8,84	
PL-55663	iPS:572033	5285	HV-75333	9 мг/л	0,55	CHZ07	HC - THTCPRCPDPDLL HC' - THTCPRCPKPKLL	не пройдена	2 + HC	145240	145208	32	8,98	
PL-55664	iPS:572035	5286	HV-75334	12 мг/л	0,9	CHZ08	HC - THTCPRCPDPDLL HC' - THTCPRCPKPKLL	не пройдена	2 + HC	145168	145138	30	8,98	
PL-55665	iPS:572037	5287	HV-75335	9 мг/л	0,63	CHZ09	HC - THTCPRCPDPDLL HC' - THTCPRCPKPKLL	пройдена		145175	145177	-2	8,98	множественные пики
PL-55666	iPS:572038	5288	HV-75336	13 мг/л	1,04	CHZ10	HC - THTCPRCPAPDDL HC' - THTCPRCPKPELL	не пройдена	2 + HC	145190	145126	64	8,84	
PL-55667	iPS:572039	5289	HV-75337	16 мг/л	1,12	CHZ11	HC - THTCPRCPAPDDL HC' - THTCPRCPKPELL	пройдена		145133	145135	-2	8,76	множественные пики
PL-55668	iPS:572040	5290	HV-75338	12 мг/л	1	CHZ12	HC - THTCPRCPDPDLL HC' - THTCPRCPKPKLL	не пройдена	2 + HC	145191	145166	25	9,09	
PL-55669	iPS:572041	5291	HV-75339	12 мг/л	0,73	CHZ13	HC - THTCPRCPDPDLL HC' - THTCPRCPKPKLL	не пройдена	2 + HC	144512	144489	23	8,99	

Фиг. 4

КОНСТРУКЦИЯ ШАРНИРА CZH01 С ЗАРЯЖЕННОЙ ЗАСТЕЖКОЙ-МОЛНИЕЙ

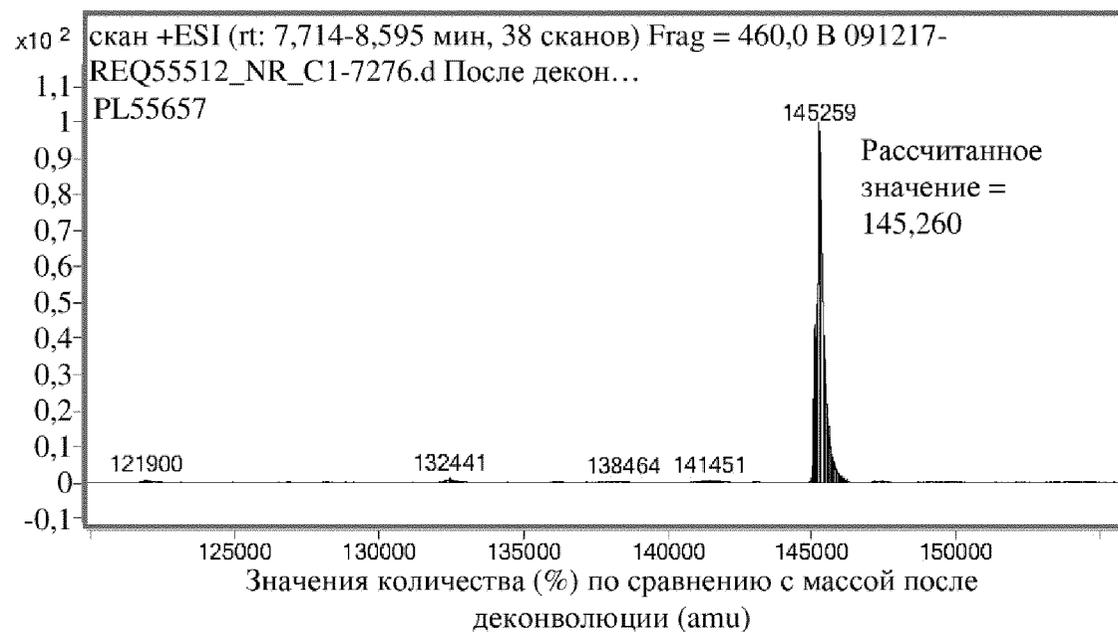
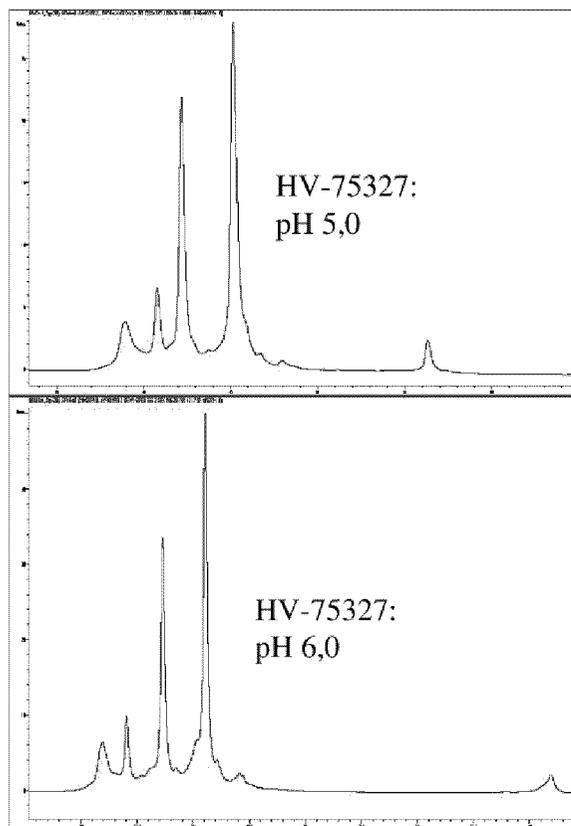


Нумерация последовательностей от кристаллической структуры 1HZH IgG1

CZH01	
Шарнир 1 HC	Шарнир 2 HC
C239	C239
P240	P240
P241	P241
C242	C242
P243K	P243D
A244K	A244D
P245K	P245D
E246K	E246D
L247K	L247D
L248C	L248C

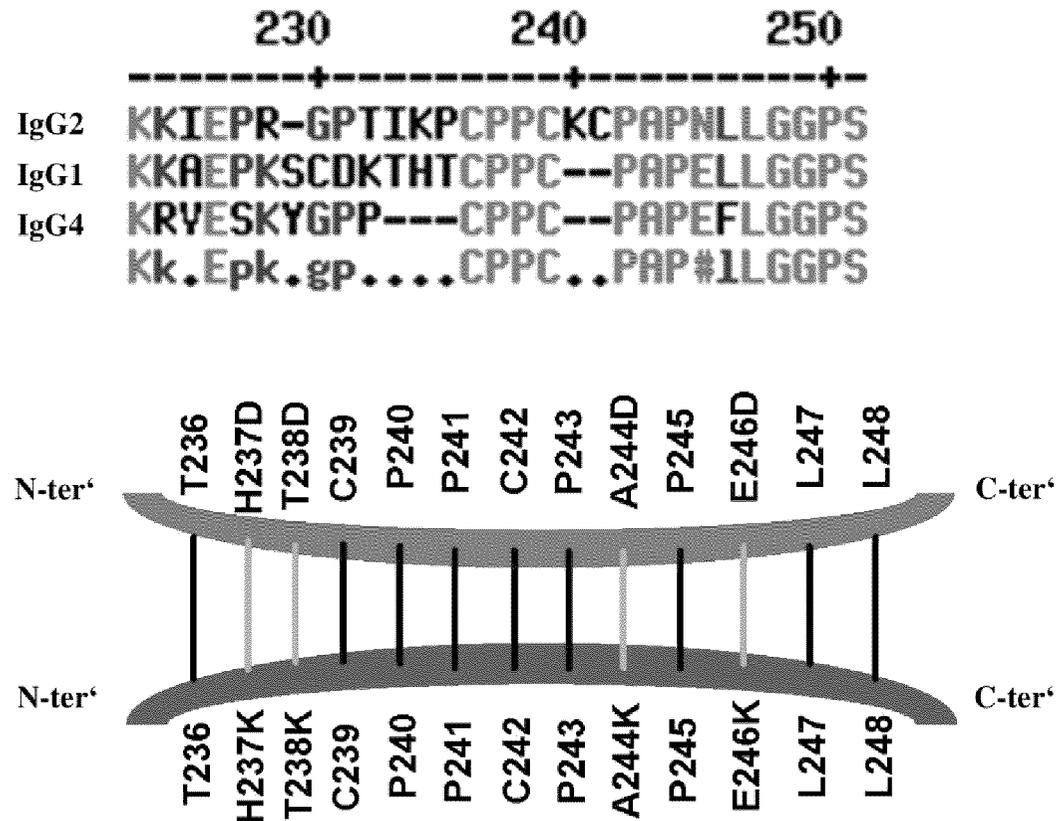
ФИГ. 5

АНАЛИТИЧЕСКАЯ СЕХ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ – СЗН01



ФИГ. 6

КОНСТРУКЦИЯ ШАРНИРА CZH09 С ЗАРЯЖЕННОЙ ЗАСТЕЖКОЙ-МОЛНИЕЙ

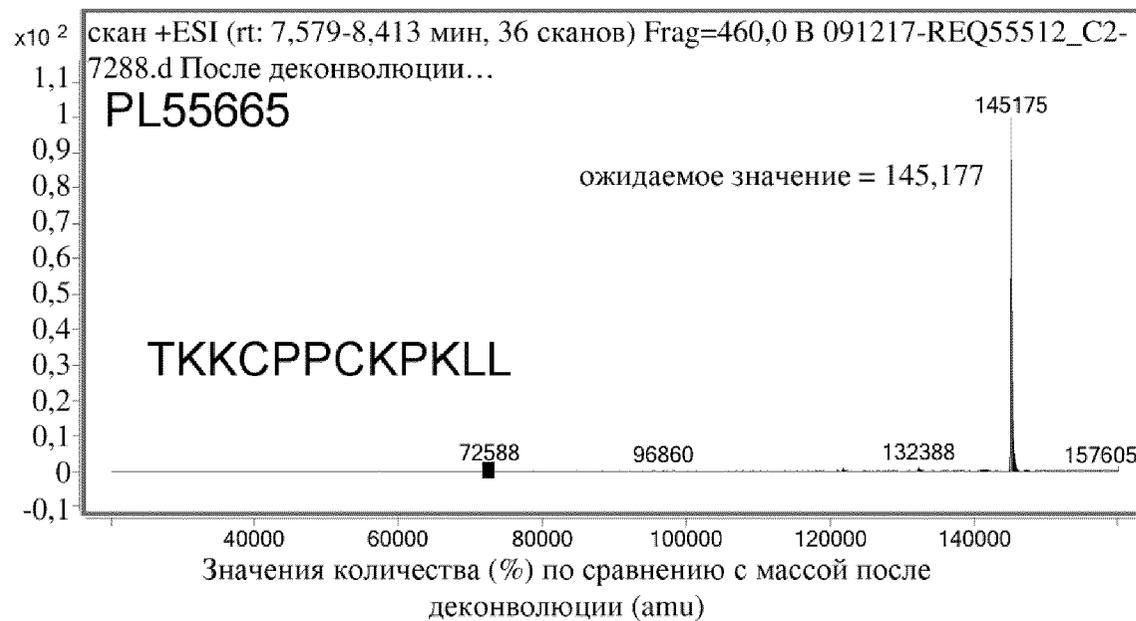
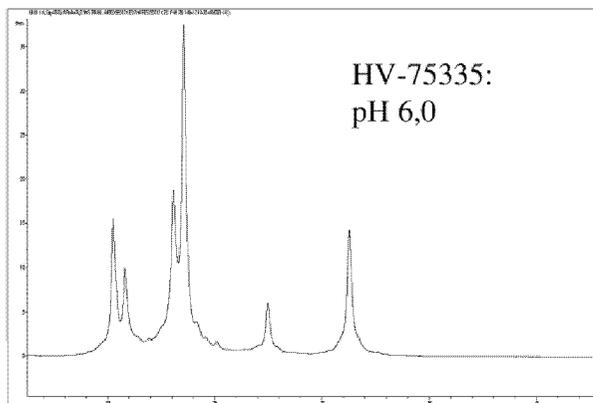
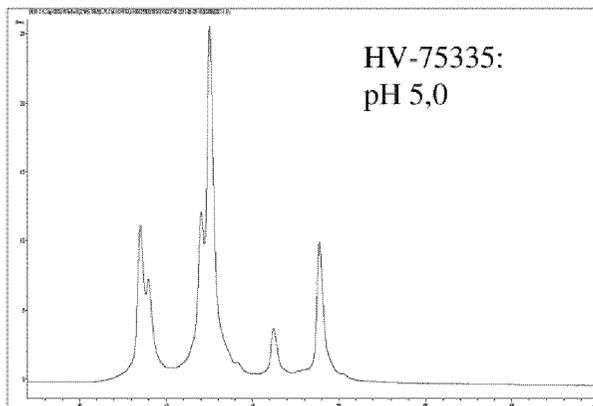


Нумерация последовательностей от кристаллической структуры 1HZH IgG1

CZH09	
Шарнир 1 НС	Шарнир 2 НС
T236	T236
H237K	H237D
T238K	T238D
C239	C239
P240	P240
P241	P241
C242	C242
P243	P243
A244K	A244D
P245	P245
E246K	E246D
L247	L247
L248	L248

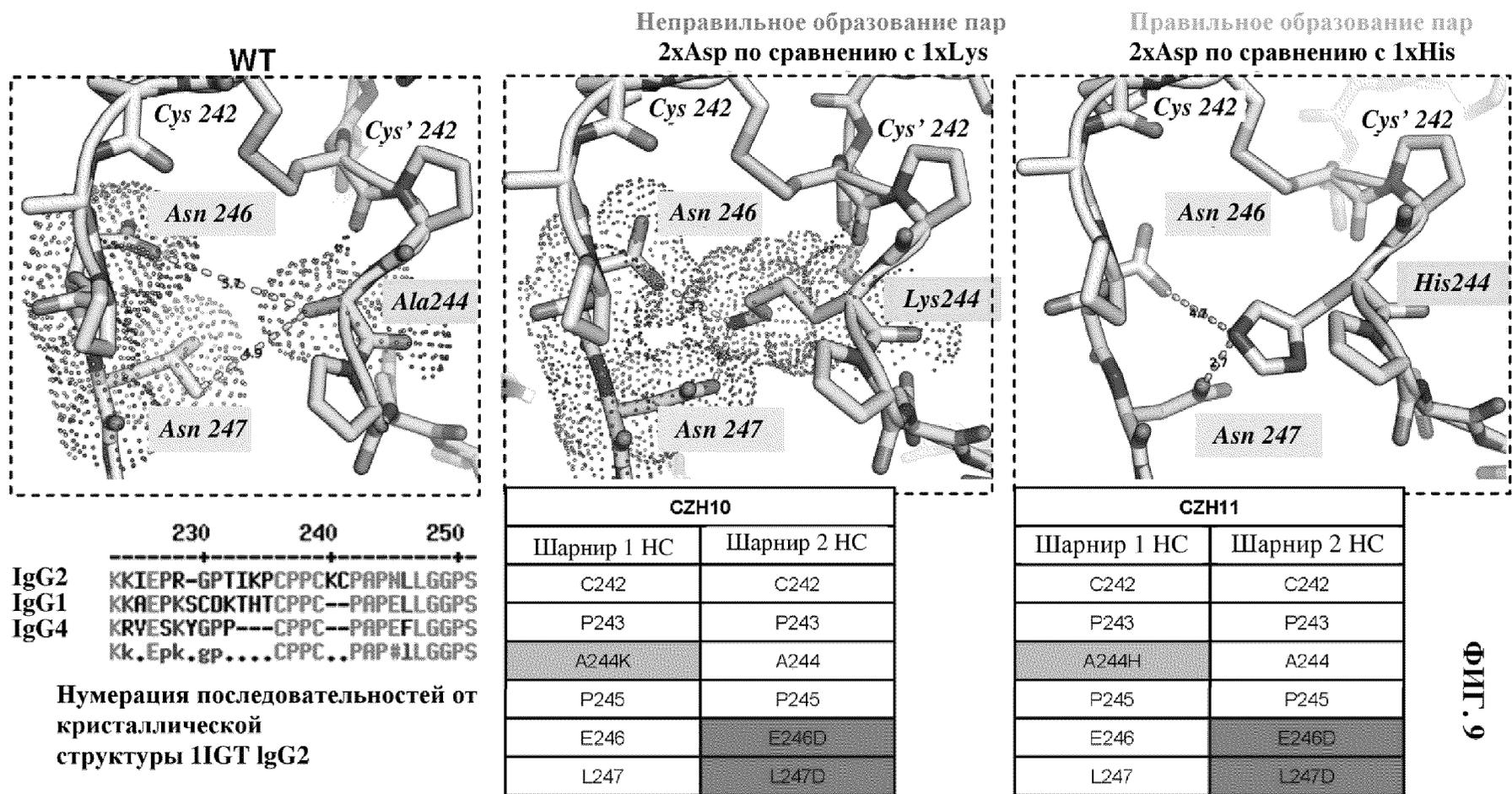
ФИГ. 7

АНАЛИТИЧЕСКАЯ СЕХ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ – СЗН09



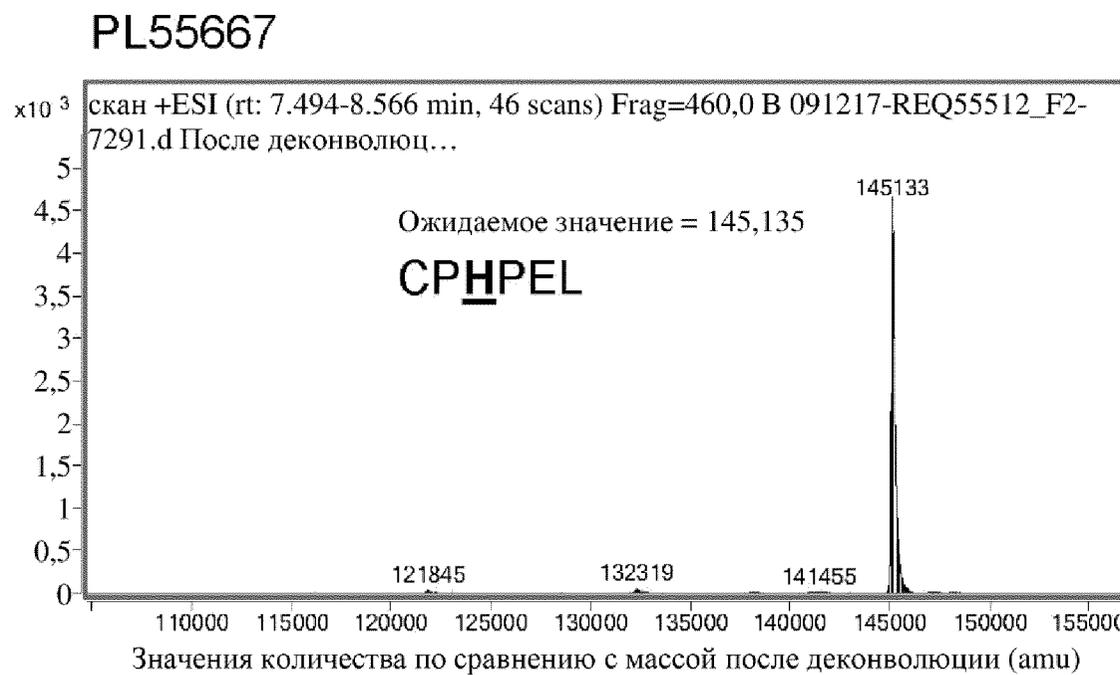
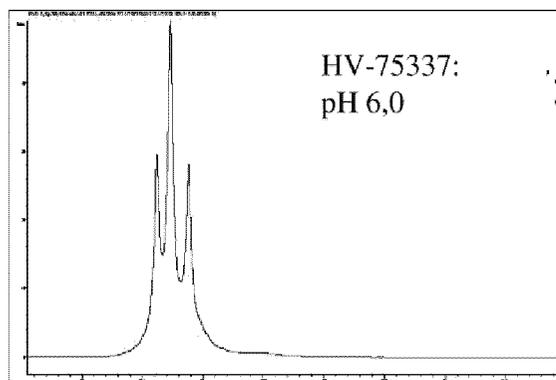
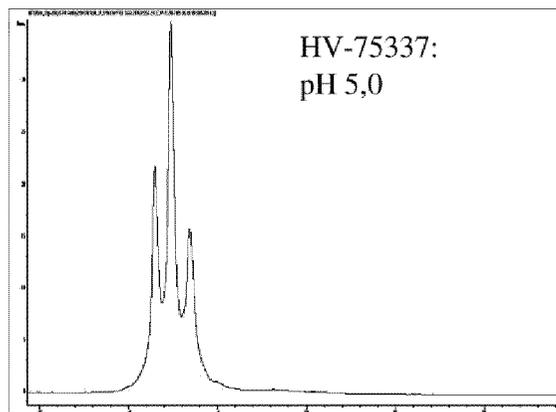
ФИГ. 8

СТРУКТУРНОЕ РУКОВОДСТВО ПО ПОЛУЧЕНИЮ ШАРНИРА С ЗАРЯЖЕННОЙ ЗАСТЕЖКОЙ-МОЛНИЕЙ



ФИГ. 9

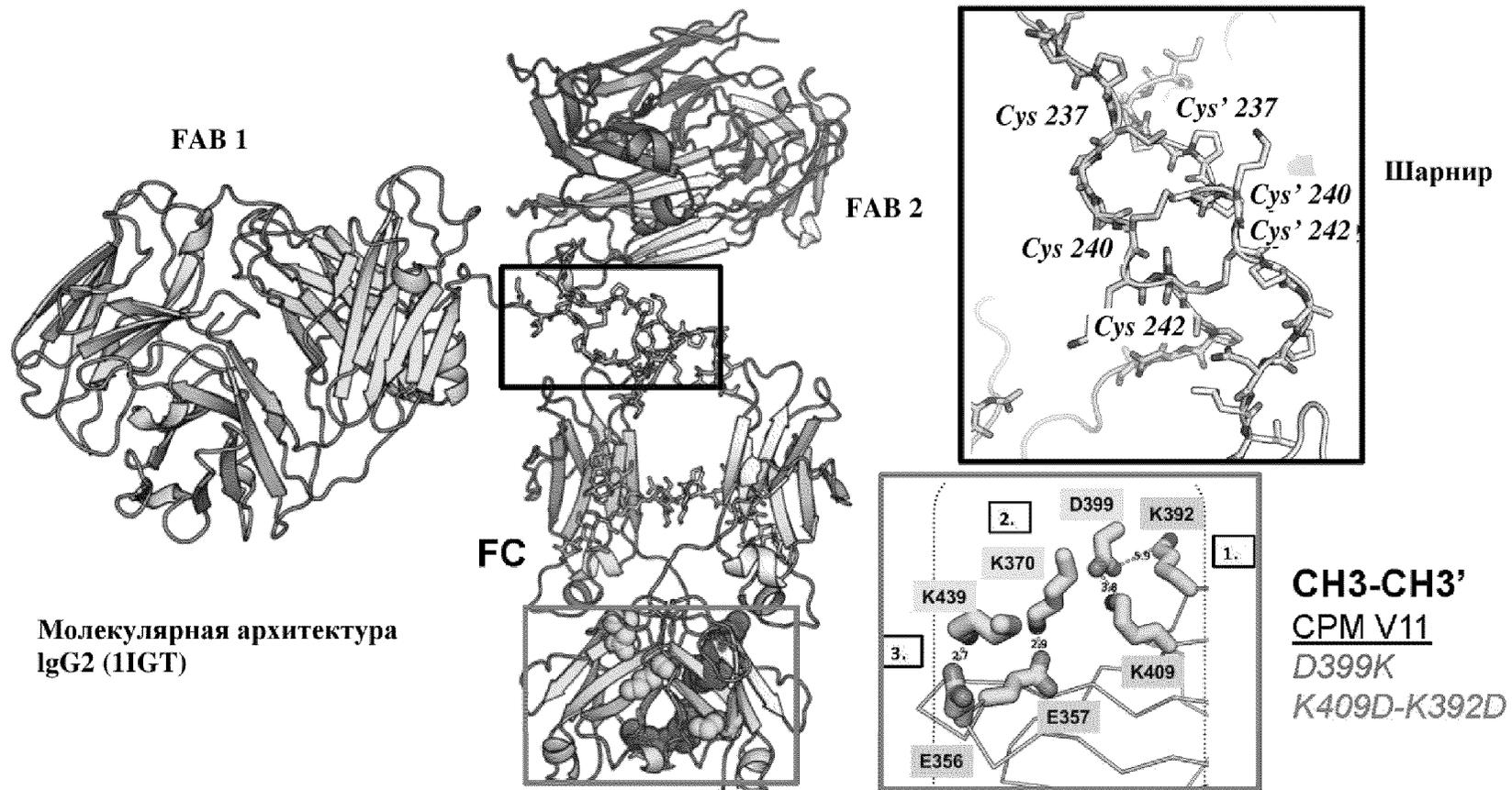
АНАЛИТИЧЕСКАЯ СЕХ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ – СЗН11



ФИГ. 10

НАЦЕЛИВАНИЕ НА ШАРНИРНУЮ ОБЛАСТЬ С ОБРАЗОВАНИЕМ ГЕТЕРОДИМЕРОВ +

CPM в CH3 V11



ФИГ. 11

СВОДНАЯ ТАБЛИЦА: КОНСТРУКЦИИ ШАРНИРОВ + СРМ В СНЗ-СНЗ' V11

Партии белков	Идентичность последовательностей белков	ID BioReg	ID сбора	Титр	Размер партии (мг)	ID конструкции	Конструкция	MSQC	Комментарии	Измеренная масса (Да)	Ожидаемая масса (Да)	Ошибка (Да)	P.I.	СІЕХ
PL-55670	iPS:566802	5292	HV-75340	13 мг/л	1	CHZ00 + V11	HC - THTCPPCPAPPELL HC' - THTCPPCPAPPELL	пройдена	Контроль	145067	145068	-1	8,75	Один пик
PL-55671	iPS:571998	5293	HV-75341	11 мг/л	0,76	CHZ01 + V11	HC - THTCPPCDDDDDDC HC' - THTCPPCKKKKKKC	пройдена		145247	145247	0	8,88	Один пик
PL-55672	iPS:572000	5294	HV-75342	8 мг/л	0,71	CHZ02 + V11	HC - THTCPPCPDDDDDC HC' - THTCPPCPKKKKKC	пройдена		145195	145198	-3	8,88	Один пик
PL-55673	iPS:572002	5295	HV-75343	10 мг/л	0,67	CHZ03 + V11	HC - THTCPPCPDPDDDC HC' - THTCPPCPKPKKC	пройдена		145148	145149	-1	8,88	Один пик
PL-55674	iPS:572004	5296	HV-75344	7 мг/л	0,61	CHZ04 + V11	HC - THTCPPCPDPDLC HC' - THTCPPCPKPKLC	не пройдена	ID неточный	145155	145132	23	8,88	один пик
PL-55675	iPS:572006	5297	HV-75345	11 мг/л	0,78	CHZ05 + V11	HC - THTCPPCPDPDLL HC' - THTCPPCPKPKLL	пройдена		145152	145154	-2	8,88	один пик
PL-55676	iPS:572008	5298	HV-75346	10 мг/л	0,68	CHZ06 + V11	HC - THTCPPCPDPPELL HC' - THTCPPCPKPLLL	пройдена		145169	145169	0	8,88	один пик
PL-55677	iPS:572010	5299	HV-75347	8 мг/л	0,65	CHZ07 + V11	HC - THDCPPCPDPDLL HC' - THKCPPCPKPKLL	не пройдена	ID неточный	145216	145195	21	8,88	один пик
PL-55678	iPS:572012	5300	HV-75348	9 мг/л	0,85	CHZ08 + V11	HC - TDTCPPCPDPDLL HC' - TKTCPPCPKPKLL	пройдена		145121	145123	-2	8,88	один пик
PL-55679	iPS:572014	5301	HV-75349	8 мг/л	0,59	CHZ09 + V11	HC - TDDCPPCPDPDLL HC' - TKKCPPCPKPKLL	пройдена		145163	145164	-1	8,75	один пик
PL-55680	iPS:572016	5302	HV-75350	14 мг/л	1,22	CHZ10 + V11	HC - THTCPPCPAPDDL HC' - THTCPPCPKPELL	не пройдена	ID неточный	145134	145113	21	8,67	один пик
PL-55681	iPS:572018	5303	HV-75351	14 мг/л	1,14	CHZ11 + V11	HC - THTCPPCPAPDDL HC' - THTCPPCPHPELL	пройдена		145120	145122	-2	8,99	один пик
PL-55682	iPS:572020	5304	HV-75352	10 мг/л	0,82	CHZ12 + V11	HC - IKPCPPCPDPDLL HC' - IKPCPPCPKPKLL	не пройдена	ID неточный	145176	145152	24	8,75	2 пика
PL-55683	iPS:572022	5305	HV-75353	8 мг/л	0,71	CHZ13 + V11	HC - ---CPPCPDPDLL HC' - ---CPPCPKPKLL	пройдена		144473	144476	-3	8,88	один пик

ФИГ. 12

12/13

АНАЛИЗ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ КОНСТРУКЦИЙ ШАРНИРОВ

Молекула	Мутация в шарнире	+ CPM в CH3 V11	BioID	Tm1	Tagg
Стандартное антитело IgG	CHZ00	N	5278-1	73,3	68,9
Стандартное антитело IgG	CHZ01	N	5279-1	73,4	73,8
Стандартное антитело IgG	CHZ09	N	5287-1	73,7	75,5
Стандартное антитело IgG	CHZ11	N	5289-1	73,2	74,4
Стандартное антитело IgG	CHZ00	Y	5292-1	70,7	73,6
Стандартное антитело IgG	CHZ01	Y	5293-1	71,9	74,2
Стандартное антитело IgG	CHZ02	Y	5294-1	71,6	74,3
Стандартное антитело IgG	CHZ03	Y	5295-1	71,9	74,4
Стандартное антитело IgG	CHZ05	Y	5297-1	71,1	71,1
Стандартное антитело IgG	CHZ06	Y	5298-1	70,8	74,2
Стандартное антитело IgG	CHZ08	Y	5300-1	69,9	73,8
Стандартное антитело IgG	CHZ09	Y	5301-1	69,8	74,3
Стандартное антитело IgG	CHZ11	Y	5303-1	69,6	73,6
Стандартное антитело IgG	CHZ13	Y	5305-1	71,1	74,3

<- Агрегация наблюдается перед полным плавлением молекул.

Наблюдения:

- 1) Мутации в шарнирах не оказывают негативного влияния на стабильность Ab.
- 2) Мутации CPM в CH3 V11, по-видимому, снижают Tm на +/- 2 градуса

ФИГ. 13

13/13