

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043819**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.27(21) Номер заявки
201201435(22) Дата подачи заявки
2011.04.20(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)(54) **ГЕТЕРОДИМЕРНЫЕ АНТИТЕЛО-F_c-СОДЕРЖАЩИЕ БЕЛКИ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ**(31) **РА 2010 00330; 61/326,082; РА 2010 01066**(32) **2010.04.20; 2010.04.20; 2010.11.24**(33) **DK; US; DK**(43) **2013.04.30**(86) **PCT/EP2011/056388**(87) **WO 2011/131746 2011.10.27**(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ГЕНМАБ А/С (DK)

(72) Изобретатель:

**Лабрейн Аран Франк, Местерс Йойсе,
Бремер Эвалд ван ден, Нейссен
Йост Й., Беркел Патрик ван, Гуэй
Барт де, Винк Том, Ван Де Винкел Ян,
Схюирман Янине, Паррен Пауль (NL)**

(74) Представитель:

**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Кузнецова Т.В.,
Соколов Р.А. (RU)**

(56) **US-A-5807706
WO-A1-2008119353
WO-A2-2007110205
WO-A1-2009089004
EP-A1-1870459**

K. GUNASEKARAN ET AL.: "Enhancing Antibody Fc Heterodimer Formation through Electrostatic Steering Effects: APPLICATIONS TO BISPECIFIC MOLECULES AND MONOVALENT IgG", *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, vol. 285, no. 25, 16 April 2010 (2010-04-16), pages 19637-19646, XP55001947, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M110.117382, e.g. abstract; page 19637, left-hand column, paragraph 1; section "Generation of Heterodimer Constructs ..." on page 1938, left-hand column; the whole document

WURCH THIERRY ET AL.: "Keystone Symposium on Antibodies as Drugs: March 27-April 1, 2009, Whistler, BC CA", *MABS, LANDES BIOSCIENCE, US*, vol. 1, no. 4, 1 July 2009 (2009-07-01), pages 318-325, XP009145415, ISSN: 1942-0870, e.g. page 322, left-hand column, paragraph 1; the whole document

(57) Изобретение относится к способу получения гетеродимерного белка (варианты). В способе предусмотрена инкубация в восстанавливающих условиях первого гомодимерного IgG антитела, включающего первый СН3-участок, которое имеет аминокислоту Arg в положении 409, и второго гомодимерного IgG антитела, включающего второй СН3-участок, которое имеет замену аминокислоты в позиции, выбранной из группы, состоящей из: (i) Ala, Glu, Gly, His, Ile, Gln, Arg, Asp, Asn, Ser, Thr, Val или Trp в положении 368, или (ii) Ala, Phe, Arg, Tyr, His или Lys в положении 399, или (iii) Ala, Asp, Glu, His, Ile, Met, Asn, Gln, Thr, Val, Tyr, Leu, Lys, Ser или Trp в положении 405, или (iv) Gly, Leu, Met или Trp в положении 407. Последовательности указанных первого и второго СН3-участков антител различны и таковы, что гетеродимерное взаимодействие между указанными первым и вторым СН3-участками сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанных первого и второго СН3-участков. Кроме того, первое и второе гомодимерные антитела содержат последовательность Cys-Pro-Pro-Cys в области шарнира. Предлагаемый способ позволяет получить высокоустойчивые биспецифические антитела с высоким выходом и чистотой. Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрен способ отбора гетеродимерного антитела с нужным свойством, гетеродимерное антитело, получаемое способом изобретения, и его применение.

043819 B1

043819 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к новым антитело-Fc-содержащим гетеродимерным белкам, таким как биспецифические антитела, и новым способам получения таких белков.

Предпосылки создания изобретения

Моноклональные антитела в последние годы становятся получившими признание терапевтически молекулами, в частности, для лечения рака. Однако, к несчастью, моноклональные антитела часто неспособны лечить заболевания, когда применяются как монотерапия. Биспецифические антитела потенциально могут преодолевать некоторые ограничения терапии моноклональными антителами, например, их можно использовать в качестве медиаторов для нацеливания лекарственного средства или токсичного соединения на клетки-мишени, в качестве медиаторов для эффекторных механизмов перенацеливания на сайты, связанные с заболеванием, или в качестве медиаторов для увеличения специфичности в отношении опухолевых клеток, например путем связывания с комбинацией молекул-мишеней, которая обнаруживается исключительно на опухолевых клетках.

Различные форматы и применения биспецифических антител недавно рассмотрены в работе Chames and Baty (2009), *Curr. Opin. Drug Disc. Dev.*, 12: 276. Одним из основных препятствий для разработки биспецифических антител является сложность получения материала в достаточном количестве и нужного качества методами традиционных технологий, таких как методы гибридных гибридом и химической конъюгации (Marvin and Zhu (1005), *Acta Pharmacol. Sin.*, 26: 649). Совместная экспрессия в клетке-хозяине двух антител, состоящих из различных тяжелых и легких цепей, ведет, кроме нужных биспецифических антител, к смеси возможных антител.

Описаны некоторые стратегии благоприятствования образованию гетеродимерного, т.е. биспецифического, продукта после коэкспрессии различных конструкций антител.

Lindhofer et al. (1995, *J. Immunol.*, 155: 219) сообщают, что слияние крысиных и мышиных гибридом, продуцирующих различные антитела, ведет к обогащению функциональными биспецифическими антителами из-за предпочтительного видоограниченного образования пар тяжелая/легкая цепь. Другой стратегией промотирования образования гетеродимеров по сравнению с гомодимерами является стратегия "выпуклость в ямку" ("knob-into-hole"), по которой выступающую часть вводят на поверхность раздела первого полипептида тяжелой цепи и соответствующей полости в поверхности раздела второго полипептида тяжелой цепи, так что выступающая часть может располагаться в полости так, что промотирует образование гетеродимера и препятствует образованию гомодимера. "Выступающие части" конструируют путем замены небольших боковых цепей аминокислот с поверхности первого полипептида на более крупные боковые цепи. Компенсаторные "полости" идентичного или схожего размера с выступающими частями создают на поверхности раздела второго полипептида путем замены крупных боковых цепей аминокислот на меньшие цепи (патент США 5731168). В EP1870459 (Chugal) и WO 2009089004 (Amgen) описываются другие стратегии для благоприятствования образованию гетеродимеров во время коэкспрессии различных доменов антител в клетке-хозяине. В таких способах один или несколько остатков, которые создают поверхность раздела СНЗ-СНЗ в обоих СНЗ-доменах, заменяют заряженными аминокислотами, так что образование гомодимера электростатически неблагоприятно и электростатически благоприятна гетеродимеризация. В WO 2007110205 (Merck) описывается еще одна стратегия, по которой для промотирования гетеродимеризации используют различия между СНЗ-доменами IgA и IgG.

Dall'acqua et al. (1998, *Biochemistry*, 37: 9266) идентифицировали пять энергетически ключевых аминокислотных остатков (366, 368, 405, 407 и 409), которые вовлекаются в контакт СНЗ-СНЗ поверхности раздела СНЗ-гомодимера.

В WO 2008119353 (Genmab) описывается способ получения биспецифических антител *in vitro*, при котором биспецифическое антитело формируется обменом "Fab-фрагментов" или "полумолекул" (обменом тяжелой цепи и присоединенной легкой цепи) между двумя моноспецифическими IgG4 или IgG4-подобными антителами после инкубации в условиях восстановления. Такая реакция обмена Fab-фрагментами является результатом реакции изомеризации дисульфидной связи и диссоциации-ассоциации СНЗ-доменов, при этом дисульфидные связи тяжелых цепей в шарнирных участках исходных (изначально моноспецифических) антител восстанавливаются, и полученные свободные цистеины образуют дисульфидную связь тяжелой цепи с цистеиновыми остатками молекулы другого исходного антитела (изначально с другой специфичностью), и одновременно СНЗ-домены исходных антител освобождаются и реформируются путем диссоциации-ассоциации. Полученный продукт представляет собой биспецифическое антитело, имеющее два Fab-фрагмента, которые потенциально содержат различные последовательности. Следует отметить, что процесс случайный, однако и обмен Fab-фрагментами также может происходить между двумя молекулами с идентичной последовательностью, или две биспецифические молекулы могут участвовать в обмене Fab-фрагментов с регенерацией антител, включающих начальную специфичность моноспецифических исходных антител.

Неожиданно обнаружилось, что путем введения асимметричных мутаций в СНЗ-участки двух моноспецифических исходных белков реакцию обмена Fab-фрагментами можно заставить стать управляемой и в соответствии с этим получить высокоустойчивые гетеродимерные белки.

Сущность изобретения

Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к эффективному *in vitro* способу получения высокоустойчивых гетеродимерных Fc-содержащих белков на основе устойчивых гомодимерных Fc-содержащих исходных материалов. Например, высокоустойчивые биспецифические антитела можно получить с высоким выходом и чистотой на основе двух устойчивых моноспецифических антител в качестве исходного материала.

Таким образом, в одном аспекте изобретение относится к *in vitro* способу получения гетеродимерного белка, причем указанный способ включает следующие стадии:

а) предоставление первого гомодимерного белка, включающего Fc-участок иммуноглобулина, причем указанный Fc-участок включает первый СНЗ-участок,

б) предоставление второго гомодимерного белка, включающего Fc-участок иммуноглобулина, причем указанный Fc-участок включает второй СНЗ-участок, при этом последовательности указанных первого и второго СНЗ-участков являются различными и таковы, что гетеродимерное взаимодействие между указанными первым и вторым СНЗ-участками сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанных первого и второго СНЗ-участков,

с) инкубация указанного первого белка вместе с указанным вторым белком в условиях восстановления, достаточных для того, чтобы дать возможность цистеинам в шарнирном участке претерпевать изомеризацию дисульфидной связи, и

д) получение указанного гетеродимерного белка.

Способ можно использовать, например, для получения *in vitro* гетеродимерных белков, таких как биспецифические антитела, для различных применений, таких как терапевтические и диагностические применения. Преимуществом такого способа *in vitro* является то, что образование пар тяжелая цепь/легкая цепь во время реакции остается интактным, так что в продукте не получается нежелательных комбинаций тяжелой цепи и легких цепей. Это контрастирует с некоторыми способами коэкспрессии, описанными на известном уровне техники (см. выше), где необходимо найти общую легкую цепь, которая может образовывать функциональное антитело вместе с обеими тяжелыми цепями для того, чтобы избежать образования нефункциональных продуктов тяжелой цепь/легкая цепь из-за произвольного образования в клетке пар тяжелой цепь/легкая цепь. Кроме того, способ *in vitro* можно выполнять в лаборатории, где возможно более хорошее регулирование, жесткость и выход гетеродимерного белка, чем это допускается коэкспрессией.

Способ *in vitro* по изобретению также можно использовать для создания библиотек соединений более крупного размера, например в способе скрининга для идентификации преимущественных комбинаций специфичностей. Например, для некоторых комбинаций мишеней антител не всякое биспецифическое антитело будет функциональным, т.е. способным связываться с обеими мишенями в одно и то же время и опосредовать нужные функциональные действия. В таких случаях биспецифическое антитело, имеющее нужное свойство, например оптимальное связывание мишени или уничтожение клетки, может быть идентифицировано путем:

а) предоставления первого набора гомодимерных антител, имеющих различные переменные участки, при этом указанные антитела указанного первого набора включают первый СНЗ-участок,

б) предоставления второго набора гомодимерных антител, имеющих различные переменные участки, при этом указанные антитела указанного второго набора включают второй СНЗ-участок, при этом последовательности указанных первого и второго СНЗ-участков являются различными и таковы, что гетеродимерное взаимодействие между указанными первым и вторым СНЗ-участками сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанных первого и второго СНЗ-участков,

с) инкубации антител указанного первого набора и указанного второго набора в условиях восстановления, достаточных для того, чтобы дать возможность цистеинам в шарнирном участке претерпевать изомеризацию дисульфидной связи, причем таким образом получают набор биспецифических антител,

д) необязательно, возврат к невозстанавливающим условиям,

е) анализа полученного набора биспецифических антител на заданное нужное свойство, и

ф) отбора биспецифических антител с нужным свойством.

В других аспектах настоящее изобретение относится к гетеродимерным белкам, полученным или которые можно получить способом по изобретению, и к способам получения гетеродимерных белков по изобретению путем коэкспрессии в подходящей клетке-хозяине.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Получение биспецифических антител путем межвидового обмена Fab-фрагментами. Образование биспецифических антител после индуцированного GSH обмена Fab-фрагментами *in vitro* между указанными антителами IgG4 специфичным к EGFR (2F8) и CD20 (7D8) определяют ELISA. В ELISA анализируют ряд концентраций (всех антител) 0-1 мкг/мл. Биспецифическое связывание выше после обмена Fab-фрагментами между антителами IgG4 макаки-резуса (Rh) и человека (Hu), чем между двумя антителами одного и того же вида.

Фиг. 2. Выравнивание коровьих аминокислотных последовательностей шарнира (т.е. последовательности CPPC в IgG1 человека, который включает два цистеиновых остатка, которые потенциально

образуют дисульфидные связи между тяжелыми цепями и соответствующими остатками в других изоформах человека или другого вида) и поверхности раздела СНЗ-СНЗ изоформ антител человека и макаки-резуса.

Фиг. 3. Получение биспецифических антител с использованием мутантного человеческого IgG1, взятого для обмена Fab-фрагментами. Образование биспецифических антител после индуцированного GSH обмена Fab-фрагментами *in vitro* между человеческим антителом IgG4, специфичным к CD20 (7D8), и человеческими антителами IgG1, специфичными к EGFR (2F8), определяют ELISA. Представленный график показывает средние числа трех независимых экспериментов по обмену Fab-фрагментами, при котором для ELISA используют общую концентрацию антител 1 мкг/мл. Биспецифическое связывание выше после обмена Fab-фрагментами между IgG1-2F8-CPSC-ITL и IgG4-7D8, чем между двумя антителами IgG4. Комбинирование IgG4-7D8 или с IgG1-2F8-CPSC или с IgG1-2F8-ITL не приводит к биспецифическим антителам в используемых условиях.

Фиг. 4. Получение биспецифических антител путем обмена Fab-фрагментами между человеческими антителами IgG4 и мутантным IgG1 *in vivo*. Образование биспецифических антител после обмена Fab-фрагментами *in vivo* у иммунодефицитных мышей между указанными человеческими антителами IgG4 к CD20 (7D8) и IgG1 к EGFR (2F8) и мутантным IgG4 определяют ELISA. Представленный график показывает средние числа ($n = 4$). Биспецифическая реакционная способность представлена как концентрация биспецифических антител относительно общей концентрации IgG (в процентах). Человеческий IgG4 со стабилизированным шарнирным участком (CPPC) или мутацией R409K в СНЗ-доме не способен участвовать в обмене Fab-фрагментами. IgG1 с последовательностью CPSC в шарнире и с мутацией в СНЗ-доме участвует в обмене Fab-фрагментами. (*) Биспецифическое связывание для смесей, содержащих IgG1-2F8 или IgG4-2F8-CPPC или IgG4-2F8-R409K ниже предела детекции и, следовательно, произвольно принимается за ноль.

Фиг. 5. Образование биспецифических антител с использованием индуцированного 2-меркаптоэтиламин-HCl (2-МЕА) обмена Fab-фрагментами между человеческими антителами IgG1 и IgG4. Образование биспецифических антител после индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами *in vitro* между указанными антителами человека к EGFR (2F8) и к CD20 (7D8) определяют ELISA. Испытывают ряд концентраций 2-МЕА 0-40 мМ. Представленный график показывает результаты ELISA, при котором используют общую концентрацию антител 20 мкг/мл. 2-МЕА эффективно вызывает обмен Fab-фрагментами также между антителами, содержащими стабилизированный шарнирный участок (CPPC). Что касается СНЗ-домов, то комбинация человеческого IgG4 с человеческим IgG1 с тройной мутацией T350I-K307T-F405L приводит к более высоким уровням биспецифичности реакционной способности по сравнению с двумя антителами IgG4 дикого типа.

Фиг. 6. Образование биспецифических антител с использованием индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами между человеческими антителами IgG1 и IgG4. Образование биспецифических антител после индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами *in vitro* между указанными человеческими антителами к EGFR (2F8) и к CD20 (7D8) определяют масс-спектрометрией для всех образцов, полученных с рядом концентраций 2-МЕА в диапазоне 0-40 мМ. (А) Приводятся характерные примеры масс-спектрометрических профилей для образцов реакций обмена Fab-фрагментами между IgG1-2F8-ITL и IgG4-7D8-CPPC с 0, 7 и 40 мМ 2-МЕА. (В) После количественной обработки данных масс-спектрометрии вычисляют процент биспецифических антител и строят график в зависимости от концентрации 2-МЕА при реакции обмена Fab-фрагментами. IgG1-2F8-ITL \times IgG4-7D8-CPPC приводит к $\sim 95\%$ биспецифических антител.

Фиг. 7. Анализ устойчивости гетеродимерных биспецифических антител, полученных обменом Fab-фрагментами, индуцированным 2-МЕА. Устойчивость биспецифических образцов, полученных индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами путем комбинации или IgG1-2F8-ITL \times IgG4-7D8-CPPC (А) или IgG4-2F8 \times IgG4-7D8 (В), испытывают путем измерения биспецифического связывания EGFR/CD20 в ELISA после реакции обмена Fab-фрагментами, вызванного GSH, в присутствии нерелевантного IgG4 в указанных концентрациях. Биспецифическое связывание приводится относительно биспецифического связывания исходного материала (контроль), которое принимают за 100%. (А) Биспецифическое связывание индуцированного 2-МЕА биспецифического продукта, образованного IgG1-2F8-ITL и IgG4-7D8-CPPC, сохраняется, что указывает на то, что продукт устойчив, и не принимает участие в обмене Fab-фрагментами в присутствии GSH. (В) Биспецифическое связывание EGFR/CD20 индуцированного 2-МЕА биспецифического продукта, образованного IgG1-2F8 и IgG4-7D8, уменьшается, указывая, что продукт участвует в обмене Fab-фрагментами с нерелевантным IgG4 в присутствии GSH.

Фиг. 8. Скорость плазменного клиренса гетеродимерных биспецифических антител, полученных обменом Fab-фрагментами, индуцированным 2-МЕА. Трех группам мышей (3 мыши на группу) инъектируют следующие антитела: (1) 100 мкг биспецифических антител, полученных *in vitro* индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8-ITL и IgG4-7D8-CPPC; (2) 100 мкг биспецифических антител + 1000 мкг нерелевантного IgG4; (3) 50 мкг IgG1-2F8-ITL + 50 мкг IgG4-7D8-CPPC. (А) Общая концентрация антител с течением времени, определенная ELISA. Кривые общей концентрации антител в

плазме одинаковые для всех антител. (B) Концентрация биспецифических антител, определенная ELISA. Биспецифичность инъекционных антител одинакова при добавлении и без добавления избытка нерелевантного IgG4. (*) Биспецифическое связывание для смеси IgG1-2F8-ITL + IgG4-7D8-CPPC ниже предела детекции, и поэтому соответствующие символы нельзя представить на указанном графике. Приводятся средние значения ELISA для двух экспериментов.

Фиг. 9. Чистота биспецифических антител, полученных обменом Fab-фрагментами между человеческими IgG1-2F8 и IgG4-7D8-CPPC. (A) Восстанавливающий SDS-PAGE (a) видны полосы соответствующие тяжелым и легким цепям, как у биспецифического образца, так и у контрольного образца IgG1. Невосстанавливающий SDS-PAGE (b). (B) Пик, полученный в анализе HP-SEC, показывает, что биспецифический образец на >98% является гомогенным, и агрегаты антител практически не обнаруживаются. (C) Масс-спектрометрия показывает, что обмен Fab-фрагментами приводит почти к 100% биспецифического продукта.

Фиг. 10. Сравнение между тройным мутантом (ITL), двойными мутантами (IT, IL, TL) и одинарным мутантом (L) человеческого IgG1-2F8 при образовании биспецифических антител путем обмена Fab-фрагментами с человеческим IgG4-7D8. Образование биспецифических антител после индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами *in vitro* между тройным и двойными мутантами человеческого IgG-2F8 и IgG4-7D8 дикого типа с шарниром CPSP (A) или мутантом IgG4-7D8-CPPC со стабилизированным шарниром (B) или одинарного мутанта IgG1-2F8-F405L и IgG4-7D8 с CPSC дикого типа или стабилизированным шарниром CPPC (C) определяют ELISA. В ELISA анализируют ряд концентраций (всех антител) 0-20 мкг/мл или 0-10 мкг/мл для экспериментов, включающих двойные и одинарные мутанты, соответственно. Комбинации с двойными мутантами IgG1-2F8-IL и -TL приводят к биспецифическому связыванию EGFR/CD20, схожему с тройным мутантом IgG1-ITL. Комбинации с IgG1-2F8-IT не приводят к биспецифическому продукту. Комбинации с одинарным мутантом IgG1-2F8-F405L приводят к биспецифическому связыванию EGFR/CD20.

Фиг. 11. Получение биспецифических антител с использованием индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами при различных температурах. Образование биспецифических антител комбинированием указанных человеческих антител к EGFR (2F8) и к CD20 (7D8) в реакциях индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами *in vitro* при 0, 20 и 37°C сопровождается ELISA. Биспецифическое связывание наиболее эффективно при 37°C и наименее при 20°C. При 0°C биспецифическое связывание не наблюдается.

Фиг. 12. Получение биспецифических антител *in vitro* обменом Fab-фрагментами, индуцированным различными восстановителями. Используют ELISA для измерения образования биспецифических антител путем комбинирования человеческих IgG1-2F8-ITL и IgG4-7D8-CPPC в реакции восстановления с рядом концентраций указанных восстановителей. Биспецифическое связывание измеряют после реакций с DTT (максимум получают при 2,5 мМ DTT) и 2-МЕА (максимум получают при 25 мМ 2-МЕА), но не с GSH. (*) Данные для концентрации GSH >10 мМ исключают из-за образования агрегатов антител.

Фиг. 13. Индуцированный 2-МЕА обмен Fab-фрагментами между мутантами IgG1-2F8-ITL и IgG1-7D8-K409X. Образование биспецифических антител после индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами *in vitro* между мутантами IgG1-2F8-ITL и указанными мутантами IgG1-7D8-K409X определяют ELISA. (A) Анализируют ряд концентраций (всех антител) 0-20 мкг/мл. Положительным контролем является очищенная партия биспецифических антител, полученных из IgG1-2F8-ITL и IgG4-7D8-CPPC. (B) Обмен оценивали как биспецифическое связывание образца в концентрации 20 мкг/мл относительно положительного контроля (черный столбик). Темно-серые столбики представляют биспецифическое связывание между контролем IgG4 (IgG4-7D8 × IgG4-2F8), отрицательным контролем (IgG1-2F8 × IgG1-7D8-K409R) и между IgG1-2F8-ITL и IgG4-7D8-CPPC. Светло-серые столбики представляют результаты одновременно выполненных реакций обмена Fab-фрагментами между указанными мутантами IgG1-7D8-K409X и IgG1-2F8-ITL.

Фиг. 14. Дегликозилирование антител не влияет на образование биспецифических антител путем обмена Fab-фрагментами, индуцированного 2-МЕА. Образование биспецифических антител после индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами *in vitro* между указанными антителами к EGFR (2F8) и к CD20 (7D8) определяют ELISA. Обмен с антителами 7D8 сравнивают с их ферментативно дегликозилированными вариантами. В ELISA анализируют ряд концентраций (всех антител) 0-20 мкг/мл. Реакции обмена Fab-фрагментами с участием дегликозилированных (деглик.) антител показаны кривыми биспецифического связывания, которые идентичны кривым исходных гликозилированных вариантов.

Фиг. 15. Возможность участия в обмене Fab-фрагментами коррелирует с силой взаимодействия СН3-СН3. (A), (B) и (C). Образование биспецифических антител индуцированным GSH обменом Fab-фрагментами между конструкциями IgG1-2F8 и IgG1-7D8 (A) или IgG4-2F8 и IgG4-7D8 (B и C) с указанными мутациями представляют как биспецифическое связывание в ELISA в зависимости от времени. Биспецифичность представляют относительно контроля IgG4-2F8 × IgG4-7D8 через 24 ч. (D) и (E). Соотношение между кажущейся K_D (табл. 2) и образованием биспецифических антител через 24 ч (фиг. 15A/B/C) для молекул на основе IgG1 (D) и молекул на основе IgG4 (E).

Фиг. 16. Выравнивание последовательностей 2F8 антитела анти-EGFR в IgG1, IgG4 и (неполного) остова IgG3. Нумерация аминокислот приведена согласно Кабат и согласно EU-индексу (обе нумерации описаны в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)).

Фиг. 17. Образование биспецифических антител путем обмена Fab-фрагментами *in vitro*, индуцированного различными восстановителями. Используют ELISA для измерения образования биспецифических антител путем комбинирования человеческих IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R в реакции восстановления с рядом концентраций указанных восстановителей. Измеренные величины OD нормализуют к сигналу биспецифического контрольного образца, полученного индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8-ITL и IgG4-7D8-CPPC, который принимают за 100%. Максимальное биспецифическое связывание измеряют после реакций с DTT в интервале концентраций 0,5-50 мМ, 2-МЕА в интервале концентраций 25-50 мМ и трис(2-карбокситил)фосфином (ТСЕР) в интервале концентраций 0,5-50 мМ, но не с GSH. (*) Данные для концентрации GSH ≥ 25 мМ исключают из-за образования агрегатов антител.

Фиг. 18. Образование биспецифических антител путем индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами между человеческими IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R. (А) Образование биспецифических антител после индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами *in vitro* определяют ELISA. Представленный график показывает результаты ELISA, в котором используют общую концентрацию антител 20 мкг/мл. 2-МЕА эффективно индуцирует обмен Fab-фрагментами *in vitro*. (В) Образование биспецифических антител после индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами *in vitro* определяют масс-спектрометрией для всех образцов ряда концентраций 2-МЕА 0-40 мМ. После количественной обработки данных масс-спектрометрии вычисляют процент биспецифических антител и строят график в зависимости от концентрации 2-МЕА в реакции обмена Fab-фрагментами. IgG1-2F8-F405L \times IgG1-7D8-K409R приводит к $\sim 100\%$ биспецифических антител, что подтверждает данные ELISA.

Фиг. 19. Чистота биспецифических антител, полученных обменом Fab-фрагментами между человеческими IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R. Масс-спектрометрия показывает, что обмен Fab-фрагментами приводит к приблизительно 100% биспецифического продукта.

Фиг. 20. Выведение из плазмы биспецифических антител, полученных обменом Fab-фрагментами, индуцированным 2-МЕА. Трех группам мышей (3 мыши на группу) инъецируют следующие антитела: (1) 100 мкг биспецифических антител, полученных *in vitro* индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R; (2) 100 мкг биспецифических антител + 1000 мкг нерелевантного IgG4. (А) Общая концентрация антител в зависимости от времени, определенная ELISA. Кривые общей концентрации антител в плазме одинаковые для всех антител. (В) Концентрация биспецифических антител, определенная ELISA. Биспецифичность инъецированных антител одинаковая при добавлении и без добавления избытка нерелевантного IgG4.

Фиг. 21. Опосредованное CDC уничтожение CD-20-экспрессирующих клеток биспецифическими антителами, полученными индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R. Используют ряд концентраций указанных антител для испытания их на способность опосредовать CDC на клетках Дауди (А) и Раджи (В). Обе клеточные линии экспрессируют CD-20, а не EGFR. Введение K409R в IgG4-7D8 не влияет на его способность индуцировать CDC. Биспецифические антитела, полученные от индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами между IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R, еще способны индуцировать CDC.

Фиг. 22. Опосредованной ADCC уничтожение EGFR-экспрессирующих клеток биспецифическими антителами, полученных индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R. Используют ряд концентраций указанных антител для испытания их на способность опосредовать ADCC на клетках A431. IgG1-7D8 не может связывать CD-20-отрицательные клетки A431 и следовательно не индуцирует ADCC. ADCC индуцируется EGFR-антителами IgG1-2F8 также после введения мутации F405L в CH3-домен. Эффекторная функция ADCC IgG1-2F8-F405L сохраняется в биспецифическом формате, полученном обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R.

Фиг. 23. Индуцированный 2-МЕА обмен Fab-фрагментами между мутантами IgG1-2F8-F405X и IgG1-7D8-K409R. Образование биспецифических антител после индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами *in vitro* между указанными мутантами IgG1-2F8-F405X и IgG1-7D8-K409R определяют ELISA. (А) В ELISA анализируют ряд концентраций (всех антител) 0-20 мкг/мл. Положительным контролем является очищенная партия биспецифических антител, полученных из IgG1-2F8-F405L \times IgG4-7D8-K409R. (В) Обмен представлен как биспецифическое связывание при концентрации антител 20 мкг/мл относительно положительного контроля (черный столбик). Темно-серые столбики представляют биспецифическое связывание между контролем IgG4 (IgG4-7D8 \times IgG4-2F8) и отрицательным контролем (IgG1-2F8 \times IgG1-7D8-K409R). Светло-серые столбики представляют результаты одновременно выполненных реакций обмена Fab-фрагментами между указанными мутантами IgG1-2F8-F405X и IgG1-7D8-K409R или контролями.

Фиг. 24. Индуцированный 2-МЕА обмен Fab-фрагментами между мутантами IgG1-2F8-Y407X и IgG1-7D8-K409R. Образование биспецифических антител после индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами *in vitro* между указанными мутантами IgG1-2F8-Y407X и IgG1-7D8-K409R определяют ELISA. (А) В ELISA анализируют ряд концентраций (всех антител) 0-20 мкг/мл. Положительным контролем является очищенная партия биспецифических антител, полученных из IgG1-2F8-F405L × IgG4-7D8-K409R. (В) Обмен представлен как биспецифическое связывание при концентрации антител 20 мкг/мл относительно положительного контроля (черный столбик). Темно-серые столбики представляют биспецифическое связывание между контролем IgG4 (IgG4-7D8 × IgG4-2F8) и отрицательным контролем (IgG1-2F8 × IgG1-7D8-K409R). Светло-серые столбики представляют результаты одновременно выполненных реакций обмена Fab-фрагментами между указанными мутантами IgG1-2F8-Y407X и IgG1-7D8-K409R или контролями.

Фиг. 25. Анализ образованных индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами биспецифических антител методом SDS-PAGE в условиях не-восстановления (фиг. 25(A)) и восстановления (фиг. 25(B)).

Фиг. 26. Профили HP-SEC гомодимерного исходного материала IgG1-2F8-F405L (фиг. 26(B)), гомодимерного исходного материала IgG1-7D8-K409R (фиг. 26(A)), смеси (1:1) двух гомодимеров (фиг. 26(C)) и биспецифического продукта, образованного индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R (фиг. 26(D)).

Фиг. 27. Масс-спектрометрия (ESI-MS) гомодимерного исходного материала IgG1-2F8-F405L (фиг. 27(B)), гомодимерного исходного материала IgG1-7D8-K409R (фиг. 27(A)), смеси (1:1) двух гомодимеров (фиг. 27(C)) и биспецифического продукта, образованного индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R (фиг. 27(D)).

Фиг. 28. Профили капиллярного изоэлектрофокусирования (сIEF) гомодимерного исходного материала IgG1-2F8-F405L (фиг. 28(A)), гомодимерного исходного материала IgG1-7D8-K409R (фиг. 28(B)), смеси (1:1) двух гомодимеров (фиг. 28(C)) и биспецифического продукта, полученного индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R (фиг. 28(D)).

Фиг. 29. Профили ВЭЖХ-СІЕХ гомодимерного исходного материала IgG1-2F8-F405L (фиг. 29(A)), гомодимерного исходного материала IgG1-7D8-K409R (фиг. 29(B)), смеси (1:1) двух гомодимеров (фиг. 29(C)) и биспецифического продукта, полученного индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R (фиг. 29(D)).

Фиг. 30. Масс-спектрометрический анализ с ионизацией электронным распылением IgG, полученного котрансфекцией экспрессирующих векторов, кодирующих тяжелую и легкую цепь IgG1-7D8-K409R или IgG1-2F8-F405L. Пики гетеродимеров показаны *. Пики гомодимера показаны f.

Фиг. 31. Реакция обмена гомодимеров IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R согласно контролю методом катионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ-СІЕХ) после впрыскивания с различными интервалами.

Фиг. 32. Остаточные гомодимеры реакции обмена, детектированные методом СІЕХ, показаны стрелками.

Фиг. 33. Образование биспецифических антител при различных концентрациях IgG, концентрациях 2-МЕА, температурах инкубации и времени при определении ELISA.

Фиг. 34. Образование биспецифических антител при различных концентрациях IgG, концентрациях 2-МЕА, температурах инкубации и времени при определении ELISA и по сравнению с контролем, который произвольно принимают за 100%.

Фиг. 35. Образование биспецифических антител при различных концентрациях IgG, концентрациях 2-МЕА, температурах инкубации и времени при анализе методом ВЭЖХ-СІЕХ.

Фиг. 36. Образование биспецифических антител после индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами *in vitro* между указанными мутантами IgG1-2F8-L368X и IgG1-7D8-K409R определяют ELISA с использованием ряда концентраций (всех антител) 0-20 мкг/мл (фиг. 36(A)). Положительным контролем является партия очищенных биспецифических антител, полученных из IgG1-2F8-F405L × IgG1-7D8-K409R. На фиг. 36(B) показано биспецифическое связывание при 20 мкг/мл относительно положительного контроля (черный столбик). Темно-серые столбики представляют биспецифическое связывание между контролем IgG4 (IgG4-7D8 × IgG4-2F8) и отрицательным контролем (IgG1-2F8 × IgG1-7D8-K409R). Светло-серые столбики представляют результаты одновременно выполненных реакций обмена Fab-фрагментами между указанными мутантами IgG1-2F8-L368X и IgG1-7D8-K409R.

Фиг. 37. Образование биспецифических антител после индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами *in vitro* между указанными мутантами IgG1-2F8-K370X и IgG1-7D8-K409R определяют ELISA с использованием ряда концентраций (всех антител) 0-20 мкг/мл (фиг. 37(A)). Положительным контролем является партия очищенных биспецифических антител, полученных из IgG1-2F8-F405L × IgG1-7D8-K409R. На фиг. 37(B) показано биспецифическое связывание при 20 мкг/мл относительно положительного контроля (черный столбик). Темно-серые столбики представляют биспецифическое связывание между контролем IgG4 (IgG4-7D8 × IgG4-2F8) и отрицательным контролем (IgG1-2F8 × IgG1-7D8-

K409R). Светло-серые столбики представляют результаты одновременно выполненных реакций обмена Fab-фрагментами между указанными мутантами IgG1-2F8-D370X и IgG1-7D8-K409R.

Фиг. 38. Образование биспецифических антител после индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами *in vitro* между указанными мутантами IgG1-2F8-D399X и IgG1-7D8-K409R определяют ELISA с использованием ряда концентраций (всех антител) 0-20 мкг/мл (фиг. 38(A)). На фиг. 38(B) показано биспецифическое связывание при 20 мкг/мл относительно положительного контроля (черный столбик). Темно-серые столбики представляют биспецифическое связывание между контролем IgG4 (IgG4-7D8 × IgG4-2F8) и отрицательным контролем (IgG1-2F8 × IgG1-7D8-K409R). Светло-серые столбики представляют результаты одновременно выполненных реакций обмена Fab-фрагментами между указанными мутантами IgG1-2F8-D399X и IgG1-7D8-K409R.

Фиг. 39. Индуцированный 2-МЕА обмен Fab-фрагментами *in vitro* между четырьмя различными комбинациями мутантов IgG1 при 15°C после инкубации в течение 0, 30, 60, 105 и 200 мин при определении сэндвич-ELISA.

Фиг. 40. Индуцированный 2-МЕА обмен Fab-фрагментами *in vitro* между четырьмя различными комбинациями мутантов IgG1 после инкубации при 15°C в течение 90 мин при определении сэндвич-ELISA.

Фиг. 41. Фосфорилирование с-Met с-Met-специфическими антителами. Клетки A549 инкубируют в течение 15 мин с HGF или набором различных антител. Белки разделяют электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии SDS и переносят на мембраны вестерн-блоттингом. Фосфорилированную с-Met, общую с-Met и β-актин детектируют антителами против фосфорилированной с-Met, общей с-Met или β-актина.

Фиг. 42. Анализ пролиферации с клетками NCI-H441. Клетки NCI-H441 инкубируют в течение семи суток с моновалентным биспецифическим IgG1 069/b12, контрольные антитела (IgG1-069, UniBody-069, IgG1-b12) оставляют необработанными. Определяют массу клеток, и строят график как процент от массы необработанных образцов (принятой за 100%).

Фиг. 43. Опосредованное CDC уничтожение CD-20-экспрессирующих клеток биспецифическими антителами, полученными индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-7D8-F405L или IgG1-2F8-405L и IgG1-7D8-K409R. Используют ряд концентраций указанных антител для испытания их на способность опосредовать CDC на клетках Дауди (A) и Раджи (B). Обе клеточные линии экспрессируют CD-20, а не EGFR. Биспецифические антитела, полученные индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-7D8-F405L и IgG1-7D8-K409R, эффективны при индукции опосредованного CDC лизиса клеток как IgG1-7D8. Биспецифические антитела, полученные индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG2-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R, приводят к моновалентным CD-20-связывающим биспецифическим антителам, что слабо влияет на индукцию опосредованного CDC уничтожения клеток.

Фиг. 44. Уничтожение клеток A431, индуцированное биспецифическими антителами HER2 × HER2, предварительно инкубированными с анти-каппа-ETA'. Жизнеспособность клеток A431 после 3-дневной инкубации с антителами HER2, предварительно инкубированными с анти-каппа-ETA'. Жизнеспособность клеток оценивают количественно с использованием Alamarblue. Приведенные данные представляют собой интенсивность флуоресценции (FI) в одном эксперименте с клетками A431, обработанными антителами HER2 и биспецифическими антителами HER2 × HER2, конъюгированными с анти-каппа-ETA'. В качестве положительного контроля используют стауроспорин, в то время как изотипичные контрольные антитела используют в качестве отрицательного контроля.

Фиг. 45. Биспецифические молекулы HER2 × HER2 индуцируют понижающую модуляцию рецептора HER2. Относительный процент уровней экспрессии HER2 в лизатах клеток AU565 после 3-дневной инкубации с 10 мкг/мл mAb. Количество HER2 определяют с использованием ELISA со специфическим захватом HER2 и отображают как ингибирование в процентах при сравнении с необработанными клетками. Приведенные данные являются средними из двух экспериментов плюс стандартное отклонение.

Фиг. 46. Анализ совместной локализации биспецифических антител HER2 × HER2 (FITC) с лизосомным маркером LAMP1 (Cy5). График пиксельной интенсивности FITC перекрывался с Cy5 для различных моноспецифических антител HER2 и биспецифических антител HER2 × HER2, (фиг. 46(B)). На графике отображены FITC пиксельные интенсивности в LAMP1/Cy5-положительных пикселях для каждого испытываемого антитела, полученные на трех различных изображениях. Моноспецифические показывают меньшие FITC пиксельные интенсивности в LAMP1/Cy5-положительных пикселях по сравнению с биспецифическими. На фигуре 46(B) представлена средняя величина пиксельной интенсивности FITC на LAMP1/Cy5-положительных пикселях, вычисленная из трех различных изображений. Вместе такие результаты показывают, что после интернализации на LAMP1/Cy5-положительных везикулах локализуются более высокие уровни биспецифических антител по сравнению с моноспецифическими антителами.

Фиг. 47. Ингибирование пролиферации моно- и биспецифическими антителами HER2. Клетки AU565 высевает в бессывороточную культуральную среду в присутствии 10 мкг/мл антител HER2 или биспецифических антител HER2 × HER2. Через трое суток с помощью Alamarblue определяют количест-

во жизнеспособных клеток, и жизнеспособность клеток представляют в виде процента относительно необработанных клеток. Изотипные контрольные антитела используют в качестве отрицательного контроля. Приведенные данные представляют собой процент жизнеспособных клеток AU565 по сравнению с необработанными клетками, измеренный пять раз \pm стандартное отклонение. * показывает, что отображена только одна точка.

Фиг. 48. Связывание моно- и биспецифических антител IgG1 и IgG1 с делетированным шарнирным участком с человеческим и мышинным FcRn при различных pH. Планшеты с человеческим и мышинным FcRn инкубируют с молекулами различных моно- и биспецифических антител IgG1 или IgG1 с делетированным шарнирным участком. Связывание с FcRn анализируют ELISA при 405 нм. (А) Связывание молекул моно- и биспецифических антител IgG1 и IgG1 с делетированным шарнирным участком (Uni-G1) с человеческим FcRn при pH 7,4 и 6,0. Связывание с человеческим FcRn очень слабое при нейтральном pH. При pH 6,0 (биспецифические) антитела эффективно связываются с человеческим FcRn, если они не содержат мутацию H435A. Молекулы IgG1 с делетированным шарнирным участком (Uni-G1) связываются с человеческим FcRn с низкой эффективностью. (В) Связывание молекул моно- и биспецифических антител IgG1 и IgG1 с делетированным шарнирным участком (Uni-G1) с мышинным FcRn при pH 7,4 и 6,0. Связывание с мышинным FcRn очень слабое при нейтральном pH. При pH 6,0 (биспецифические) антитела эффективно связываются с мышинным FcRn, если они не содержат мутацию H435A в обоих Fab-фрагментах. Биспецифическая молекула, содержащая мутацию H435A только в одном Fab-фрагменте, еще способна связывать мышинный FcRn. Молекулы IgG1 с делетированным шарнирным участком (Uni-G1) связываются с мышинным FcRn с промежуточной эффективностью, и биспецифическая молекула IgG1 с делетированным шарнирным участком (Uni-G1), содержащая мутацию H435A только в одном Fab-фрагменте, несколько менее эффективна.

Фиг. 49. Опосредованная Т-клетками цитотоксичность клеток AU565, индуцированная биспецифическими антителами Her2 \times CD3, а также мутантами N297Q биспецифических антител Her2 \times CD3.

Подробное описание изобретения

Определения.

Термин "иммуноглобулин" относится к классу структурно родственных гликопротеинов, состоящих из двух пар полипептидных цепей - одной пары легких (L) низкомолекулярных цепей и одной пары тяжелых (H) цепей, и все четыре соединены между собой дисульфидными связями. Структура иммуноглобулинов хорошо охарактеризована. См., например, *Fundamental Immunology*, Ch.7 (Paul W., ed., 2nd ed., Raven Press, N.Y. (1989)). Коротко, каждая тяжелая цепь как правило состоит из переменного участка тяжелой цепи (в данном случае сокращенно VH) и константного участка тяжелой цепи. Константный участок тяжелой цепи как правило состоит из трех доменов CH1, CH2 и CH3. Тяжелые цепи соединяются между собой дисульфидными связями в так называемом "шарнирном участке". Каждая легкая цепь как правило состоит из переменного участка легкой цепи (в данном случае сокращенно VL) и константного участка легкой цепи. Константный участок легкой цепи как правило состоит из одного домена CL. Как правило, нумерацию аминокислотных остатков в константном участке выполняют согласно EUI-индексу, как описано в Kabat et al., *Sciences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Фиг. 16 дает общее представление о нумерации EU и Kabat для различающихся по изотипу форм антитела 2F8 (WO 02/100348). Участки VH и VL также могут быть подразделены на участки гипервариабельности (или гипервариабельные участки, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или по форме структурно определенных петель), также называемые участками, определяющими комплементарность (CDR), чередующиеся с участками, которые более консервативны, называемыми каркасными участками (FR). Каждый VH и VL как правило состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (см. также Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196,901,917(1987)).

Используемый в данном описании термин "Fab-фрагмент" относится к одной паре тяжелая цепь - легкая цепь.

Используемый в данном описании термин "Fc-участок" относится к участку антитела, включающему, по меньшей мере, шарнирный участок, домен CH2 и домен CH3.

Термин "антитело" (Ab) в контексте настоящего изобретения относится к молекуле иммуноглобулина, фрагменту молекулы иммуноглобулина или его любому производному, которое имеет способность специфически связываться с антигеном в типичных физиологических условиях со временем полужизни в существенный период времени, такой как, по меньшей мере, примерно 30 мин, по меньшей мере, примерно 45 мин, по меньшей мере, примерно один час, по меньшей мере, примерно 2 ч, по меньшей мере, примерно 4 ч, по меньшей мере, примерно 8 ч, по меньшей мере, примерно 12 ч, примерно 24 ч или более, примерно 48 ч или более, примерно 3, 4, 5, 5, 7 или более суток, и т.д., или в любой другой релевантный функционально определенный период (такой как время, достаточное для индукции, промотирования, усиления и/или модуляции физиологической реакции, связанной со связыванием антитела с антигеном, и/или время, достаточное для осуществления эффекторной активности антитела). Вариабельные

участки тяжелой и легкой цепей молекулы иммуноглобулина содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные участки антител (Ab) могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (такие как эффекторские клетки) и компоненты системы комплемента, такие как C1q - первый компонент в классическом пути активации комплемента. Антитело также может представлять собой биспецифическое антитело, диантитело или подобную молекулу. Термин "биспецифическое антитело" относится к антителу со специфичностью в отношении, по меньшей мере, двух различных эпитопов, как правило, неперекрывающихся эпитопов. Как указано выше, термин "антитело" в данном описании, если не указано или четко не следует из контекста иное, включает фрагменты антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Такие фрагменты могут быть получены любым известным методом, таким как ферментативное расщепление, пептидный синтез и рекомбинантные методы синтеза. Показано, что антигенсвязывающая функция может быть выполнена фрагментами полноразмерного антитела, например, фрагментом F(ab')₂. Также следует иметь в виду, что термин "антитело", если не указано иное, также включает поликлональные антитела, моноклональные антитела (mAb), антителоподобные полипептиды, такие как химерные антитела и гуманизированные антитела. Полученное антитело может обладать любым изотипом.

Термин "полноразмерное антитело", используемый в данном описании, относится к антителу, которое содержит все константные и переменные домены тяжелой и легкой цепей, которые обычно обнаруживаются в антителе указанного изотипа.

Термин "изотип", когда используется в данном описании, относится к классу иммуноглобулинов (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM), который кодирован генами константного участка тяжелой цепи.

Предполагается, что термин "человеческое антитело", используемый в данном описании, включает антитела, имеющие переменные и константные участки, образованные из последовательностей иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии. Человеческие антитела по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодированные последовательностями иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии (например, мутации, введенные неспецифическим или сайтнаправленным мутагенозом *in vitro*, или соматическую мутацию *in vivo*). Однако термин "человеческое антитело", используемый в данном описании, не предполагает включение антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, привиты на человеческие последовательности остова.

Термин "тяжелоцепочечное антитело", когда используется в данном описании, относится к антителу, которое состоит только из двух тяжелых цепей и лишено легких цепей, обычно обнаруживаемых в антителах. Тяжелоцепочечные антитела, которые встречаются в природе, например у камелид, могут связывать антигены, несмотря на наличие только VH-доменов.

Термин "эпитоп" обозначает белковую детерминанту, способную специфически связываться с антителом. Эпитопы обычно состоят из группировки на поверхности молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и обычно имеют специфические трехмерные характеристики, а также специфические зарядные характеристики. Конформационные и неконформационные эпитопы различаются в том, что связывание с первыми, но не с последними, утрачивается в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп может включать аминокислотные остатки, непосредственно вовлеченные в связывание (также называемые иммунодоминантным компонентом эпитопа), и другие аминокислотные остатки, которые не вовлечены непосредственно в связывание, такие как аминокислотные остатки, которые эффективно блокированы специфическим антигенсвязывающим пептидом (иными словами, аминокислотный остаток находится внутри следа специфического антигенсвязывающего пептида).

Термин "связывание", когда используется в данном описании в контексте связывания антитела с предварительно установленным антигеном, как правило относится к связыванию с аффинностью, соответствующей K_D примерно 10^{-6} М или менее, например, 10^{-7} М или менее, такой как примерно 10^{-8} или менее, такой как примерно 10^{-9} М или менее, или примерно 10^{-10} М или даже меньше, при определении, например, технологией поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе BIAcore 3000 с использованием антигена в качестве лиганда и антитела в качестве аналита, и связывания с предварительно установленным антигеном с аффинностью, соответствующей K_D , которая, по меньшей мере, в десять раз меньше, настолько как, например, в 100 раз меньше, например, по меньшей мере, в 1000 раз меньше, настолько как, например, в 10000 раз меньше, например, по меньшей мере, в 100000 раз меньше, чем его аффинность в случае связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином) иным, чем предварительно установленный антиген или близкородственный антиген. Величина, на которую аффинность меньше, зависит от K_D антитела, так что когда K_D антитела очень низкая (т.е. антитело является высокоспецифическим), тогда величина, на которую аффинность к антигену меньше, чем аффинность к неспецифическому антигену, может составлять, по меньшей мере, 10000 раз. Термин " K_D " (М), используемый в данном описании, относится к константе равновесия диссоциации определенного взаимодействия антитело-антиген.

Термин "гетеродимерное взаимодействие между первым и вторым СН3-участками", когда исполь-

зается в данном описании, относится к взаимодействию между первым СНЗ-участком и вторым СНЗ-участком в гетеродимерном белке с первым СНЗ/вторым СНЗ.

Термин "гетеродимерные взаимодействия первого и второго СНЗ-участков", когда используется в данном описании, относится к взаимодействию между первым СНЗ-участком и другим первым СНЗ-участком в гомодимерном белке с первым СНЗ/первым СНЗ и взаимодействию между вторым СНЗ-участком и другим вторым СНЗ-участком в гомодимерном белке со вторым СНЗ/вторым СНЗ.

Термин "изолированное антитело", используемый в данном описании, означает, что материал удален из его начальной окружающей среды (например, естественной окружающей среды, если оно встречается в природе, или клетки-хозяина, если оно является экспрессированным рекомбинантно). Также выгодно, когда антитела находятся в очищенной форме. Термин "очищенный" на требует абсолютной чистоты; скорее предполагается, что это относительное определение, указывающее на возрастание концентрации антитела относительно концентрации примесей в композиции при сравнении с исходным материалом.

Предполагается, что термин "клетка-хозяин", используемый в данном описании, относится к клетке, в которую введен экспрессирующий вектор, например экспрессирующий вектор, кодирующий антитело по изобретению. Рекомбинантные клетки-хозяева включают, например, трансфектомы, такие как клетки CHO, клетки НЕК293, клетки NS/0 и лимфоциты.

Когда используется в данном описании, термин "коэкспрессия" двух или большего числа нуклеотидных конструкций относится к экспрессии двух конструкций в одной клетке-хозяине.

Термин "белок опухолевой клетки" относится к белку, локализованному на клеточной поверхности опухолевой клетки.

Термин "эффektorная клетка", используемый в данном описании, относится к иммунной клетке, которая вовлечена в эффektorную фазу иммунной реакции в противоположность когнитивной и активационной фазам иммунной реакции. Примеры иммунной клетки включают клетку миелоидного или лимфоидного происхождения, например лимфоциты (такие как В-клетки и Т-клетки, включая цитотоксичные Т-клетки (CTL)), клетки-киллеры, естественные клетки-киллеры, макрофаги, моноциты, эозинофилы, полиморфноядерные клетки, такие как нейтрофилы, гранулоциты, тучные клетки и базофилы. Некоторые эффektorные клетки экспрессируют специфические Fc-рецепторы и выполняют специфические иммунные функции. В некоторых воплощениях эффektorная клетка способна индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), такая как естественная клетка-киллер, способная индуцировать ADCC. В некоторых воплощениях эффektorная клетка может осуществлять фагоцитоз антигенамишени или клетки-мишени.

Термин "условия восстановления" или "восстанавливающая окружающая среда" относится к условию или окружающей среде, в которой субстрат, где цистеиновый остаток в шарнирной области антитела, вероятнее становится восстановленным, чем окисленным.

Термин "изомеризация дисульфидной связи" относится к обмену дисульфидными связями между различными цистеинами, т.е. сдвигу дисульфидных связей.

Другие аспекты и воплощения изобретения

Как описано выше, в первом аспекте изобретение относится к способу получения *in vitro* гетеродимерного белка, причем указанный способ включает следующие стадии:

- a) предоставление первого гомодимерного белка, включающего Fc-участок иммуноглобулина, причем указанный Fc-участок включает первый СНЗ-участок,
- b) предоставление второго гомодимерного белка, включающего Fc-участок иммуноглобулина, причем указанный Fc-участок включает второй СНЗ-участок, при этом последовательности указанных первого и второго СНЗ-участков являются различными и таковы, что гетеродимерное взаимодействие между указанными первым и вторым СНЗ-участками сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанных первого и второго СНЗ-участков,
- c) инкубация указанного первого белка вместе с указанным вторым белком в условиях восстановления, достаточных для того, чтобы дать возможность цистеинам в шарнирном участке претерпевать изомеризацию дисульфидной связи, и
- d) получение указанного гетеродимерного белка.

Биспецифический формат можно использовать во многих способах получения нужных комбинаций биспецифических антител. Кроме возможности комбинирования антител, селективно нацеленных на различные антигены, его можно использовать для изменения нужного свойства, например, для повышения CDC, путем комбинирования двух различных антител, нацеленных на один и тот же антиген. Кроме того, его можно использовать для удаления частичной агонистической активности антагонистического антитела или превращения агонистического антитела в антагонистическое антитело путем получения его биспецифического антитела с нерелевантным (неактивным) антителом.

В одном воплощении гомодимерные белки выбирают из группы, включающей: (i) Fc-участок, (ii) антитело, (iii) слитый белок, включающий Fc-участок, такой как Fc-участок, слитый с рецептором, цитокином или гормоном, и (iv) Fc-участок, конъюгированный с пролекарством, пептидом, лекарственным средством или токсином.

В некоторых воплощениях указанные первый и/или второй гомодимерный белок включает, кроме Fc-участка, один или несколько или все другие участки антитела, т.е. CH1-участок, VH-участок, CL-участок и/или VL-участок. Так, в одном воплощении указанный первый гомодимерный белок представляет собой полноразмерное антитело. В другом воплощении указанный второй гомодимерный белок представляет собой полноразмерное антитело.

В важном воплощении указанные первый и второй гомодимерные белки оба представляют собой антитела, предпочтительно, полноразмерные антитела, и связывают различные эпитопы. В таком воплощении полученный гетеродимерный белок представляет собой биспецифическое антитело. Указанные эпитопы могут быть локализованы на различных антигенах или на одном и том же антигене.

Однако в других воплощениях только один из гомодимерных белков представляет собой полноразмерное антитело, а другой гомодимерный белок не является полноразмерным антителом, например Fc-участком без варибельного участка, экспрессированным совместно с другим белком или пептидной последовательностью, подобной рецептору, цитокину или гормону, или конъюгированным с пролекарством, лекарственным средством или токсином. В другом воплощении ни один из гомодимерных белков не является полноразмерным антителом. Например, оба гомодимерных белка могут представлять собой Fc-участки, которые слиты с другим белком или пептидной последовательностью, подобной рецептору, цитокину или гормону, или конъюгированы с пролекарством, лекарственным средством или токсином.

В одном воплощении Fc-участок первого гомодимерного белка является участком изотипа, выбранного из группы, включающей IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и Fc-участок второго гомодимерного белка из изотипа, выбранного из группы, включающей IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В предпочтительном воплощении Fc-участки обоих указанных первого и второго гомодимерных белков являются участками изотипа IgG1. В другом предпочтительном воплощении один из Fc-участков указанных гомодимерных белков изотипа IgG1, и другой изотипа IgG4. В последнем воплощении полученный гетеродимер включает Fc-участок изотипа IgG1 и Fc-участок изотипа IgG4, и таким образом, может иметь представляющие интерес промежуточные свойства в отношении активации эффекторных функций. Подобный продукт можно получить, если указанный первый и/или указанный второй гомодимерный белок включает мутацию, удаляющую акцепторный сайт для Asp-связанного гликозилирования, или обработан иначе для изменения свойств гликозилирования.

В другом воплощении один или оба гомодимерных белка подвергают гликоинженерии для восстановления фукозы и таким образом усиливают ADCC, например, путем добавления соединений в культуральные среды во время продуцирования антител, как описано в US 2009317869, или как описано в van Berket et al. (2010), *Biotechnol. Bioeng.*, 105: 350, или с использованием нокаутированных FUT6 клеток, например, как описано в Yamane-Ohnuki et al. (2004), *Biotechnol. Bioeng.*, 87: 614. С другой стороны, ADCC можно оптимизировать с использованием способа, описанного в Umaña et al (1999), *Nature Biotech.*, 17: 176.

В другом воплощении один или оба гомодимерных белка конструируют так, чтобы усилить активацию комплемента, как это описано в Natsume et al (2009) *Cancer Sci.* 100:2411.

В другом воплощении один или оба гомодимерных белка подвергают методам инженерии для уменьшения или усиления связывания с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) для того, чтобы манипулировать временем полужизни в сыворотке гетеродимерного белка.

В другом воплощении один или оба гомодимерных белка подвергают методам инженерии для не связывания с белком А, причем таким образом создается возможность отделения гетеродимерного белка от указанного гомодимерного исходного белка путем пропускания продукта через колонку с белком А. В частности, это может быть применимо для воплощений, в которых используют избыток одного гомодимерного белка относительно другого гомодимерного белка как исходного материала. В таких воплощениях может быть подходящим создание гомодимерного белка, который находится в таком избытке, что он утрачивает свою способность связывать белок А. Затем после реакции гетеродимеризации гетеродимерный белок можно отделить от излишка непрореагировавшего гомодимерного белка путем пропускания через колонку с белком А.

В другом воплощении один или оба гомодимерных белка представляют собой Fc-участок или полноразмерное антитело, узнающее нерелевантный эпитоп или полноразмерное антитело, содержащее последовательности, произошедшие от зародышевой линии, которые не подвергались соматической гипермутации и не связываются с аутоантигенами. В таком воплощении гетеродимерный белок функционирует как одновалентное антитело. В другом воплощении оба гомодимерных белка включают одну и ту же тяжелую цепь, но только один из гомодимерных белков содержит легкую цепь, которая образует функциональный антигенсвязывающий активный центр антитела с указанной тяжелой цепью, в то время как другой гомодимерный белок содержит нефункциональную легкую цепь, которая не связывает никакой антиген в комбинации с указанной тяжелой цепью. В таком воплощении гетеродимерный белок функционирует как моновалентное антитело. Такая нефункциональная легкая цепь может представлять собой, например, последовательность, произошедшую от зародышевой линии, которая не подвергалась соматической гипермутации и не связывает аутоантигены.

Антитела, используемые в качестве гомодимерного исходного материала по настоящему изобрете-

нию, можно получить, например, методом гибридом, впервые описанным Kohler et al., Nature, 256, 495 (1975), или можно получить методами рекомбинантных ДНК. Моноклональные антитела также можно выделить из фаговой библиотеки антител с использованием методов, описанных, например, в Clackson et al., Nature, 352, 624-628 (1991), и в Marks et al., J. Mol. Biol., 222, 581-597 (1991). Моноклональные антитела можно получить из любого подходящего источника. Так, например, моноклональные антитела можно получить из гибридом, полученных из В-клеток селезенки мыши, полученных от мышей, иммунизированных антигеном, представляющим интерес, например, в виде клеток, экспрессирующих антиген на поверхности, или нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген, представляющий интерес. Моноклональные антитела также можно получить из гибридом, полученных из антителоэкспрессирующих клеток иммунизированных людей или млекопитающих, не относящихся к человеку, таких как крысы, собаки, приматы и т.д.

Антитела, используемые в качестве гомодимерного исходного материала по настоящему изобретению, могут представлять собой, например, химерные или гуманизированные антитела. В другом воплощении один или оба гомодимерных исходных белка, за исключением любых специфических мутантов, представляют собой человеческие антитела. Человеческие моноклональные антитела можно получать с использованием трансгенных или трансхромосомных мышей, например, мышей HuMab, несущих части иммунной системы человека, а не системы мыши. Мышь HuMab содержит минилокусы гена иммуноглобулина человека, который кодирует неперестроенные последовательности тяжелой цепи (μ и γ) и легкой цепи иммуноглобулина человека, вместе с мутациями-мишенями, которые инактивируют эндогенные локусы цепи μ и κ (Lonberg N. et al., Nature, 368, 856-859 (1994)). Соответственно, мыши проявляют пониженную экспрессию мышинового IgM или κ , и в ответ на иммунизацию, введенные трансгены тяжелой и легкой цепи человека претерпевают переключение класса и соматическую мутацию с образованием высокоаффинных моноклональных человеческих антител IgG κ (Lonberg N. et al. (1994), цит. выше; обзор в Lonberg N. Handbook of Experimental Pharmacology, 113, 49-101 (1994); Lonberg N. and Huszar D., Intern. Rev. Immunol., Vol. 13, 65-93 (1995), и в Harding F. and Lonberg N., Ann. N.Y. Acad. Sci., 764, 536-546 (1995)). Получение мышей HuMab подробно описано в Taylor L. et al., Nucleic Acids Research., 20, 6287-6295 (1992); Chen J. et al., International Immunology, 5, 647-656 (1993); Tuaille et al., J. Immunol., 152, 2912-2920 (1994); Taylor L. et al., International Immunology, 6, 579-591 (1994); Fishwild D. et al., Nature Biotechnology, 14, 845-851 (1996). См. также US 5545806, US 5569825, US 5625126, US 5633425, US 5789650, US 5877397, US 5661016, US 5814318, US 5874299, US 5770429, US 5545807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 и WO 01/09187. Спленциты от таких трансгенных мышей можно использовать для создания гибридом, которые секретируют человеческие моноклональные антитела, согласно хорошо известным методам.

Кроме того, человеческие антитела по настоящему изобретению или антитела по настоящему изобретению других видов можно идентифицировать с помощью технологий дисплейного типа, в том числе, без ограничения, фагового дисплея, ретровирусного дисплея, рибосомного дисплея, дисплея млекопитающего, и других методов, с использованием методов, хорошо известных в технике, и полученные молекулы можно подвергнуть дополнительному созреванию, такому как аффинное созревание, так как такие методы хорошо известны в технике.

В другом воплощении изобретения антитело или его часть, например, один или несколько CDR, происходят от вида семейства верблюжьих, см. WO 2010001251, или вида хрящевых рыб, такого как акула-нянька, или представляют собой тяжелоцепочечные или доменные антитела.

В одном воплощении способа по изобретению указанные первый и второй гомодимерные белки, представленные на стадиях a) и b), очищают.

В одном воплощении указанный первый и/или второй гомодимерный белок конъюгирован с лекарственным средством, пролекарством или токсином или содержит акцепторную группу для них. Такая акцепторная группа может представлять собой, например, неприродную аминокислоту.

Как описано выше, последовательности первого и второго СНЗ-участков гомодимерных исходных белков являются различными и таковы, что гетеродимерное взаимодействие между указанными первым и вторым СНЗ-участками сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанных первого и второго СНЗ-участков.

В одном воплощении повышенная сила гетеродимерного взаимодействия по сравнению с каждым из гомодимерных взаимодействий имеет место из-за модификаций СНЗ иных, чем введение ковалентных связей, цистеиновых остатков или заряженных остатков.

В некоторых воплощениях продукт по изобретению является высокоустойчивым и не претерпевает обмена Fab-фрагментами в умеренных условиях реакции *in vitro* или, что важно, *in vivo* после введения в организм человека. Так, в одном воплощении гетеродимерное взаимодействие между указанными первым и вторым белками в полученном гетеродимерном белке таково, что обмен Fab-фрагментами может происходить при 0,5 мМ GSH в условиях, описанных в примере 13.

В другом воплощении гетеродимерное взаимодействие между указанными первым и вторым белками в полученном гетеродимерном белке таково, что обмен Fab-фрагментами происходит *in vivo* у мы-

шей в условиях, описанных в примере 14.

В другом воплощении гетеродимерное взаимодействие между указанными первым и вторым белками в полученном гетеродимерном белке сильнее более чем в два раза, например сильнее более чем в три раза, например сильнее более чем в пять раз чем самое сильное из двух гомодимерных взаимодействий, например, при определении таким образом, как описано в примере 30.

В другом воплощении последовательности указанных первого и второго СНЗ-участков таковы, что константы диссоциации гетеродимерного взаимодействия между указанными первым и вторым белками в полученном гетеродимерном белке ниже 0,05 микромоляр, когда анализ проводят так, как описано в примере 30.

В другом воплощении последовательности указанных первого и второго СНЗ-участков таковы, что константы диссоциации обоих гомодимерных взаимодействий превышают 0,01 микромоляр, таковы как выше 0,05 микромоляр, предпочтительно от 0,01 до 10 микромоляр, таковы как от 0,05 до 10 микромоляр, предпочтительнее от 0,01 до 5 микромоляр, например от 0,05 до 5 микромоляр, даже предпочтительнее от 0,01 до 1 микромоляр, например от 0,05 до 1 микромоляр, от 0,01 до 0,5 микромоляр или от 0,01 до 0,1 микромоляр, когда анализ проводят так, как описано в примере 21. Воплощения, в которых гомодимерные исходные белки являются относительно устойчивыми, могут иметь преимущество в том, что легче получить большое количество исходного белка и, например, избежать агрегации или ошибочной укладки.

В некоторых воплощениях устойчивый гетеродимерный белок можно получить с высоким выходом с использованием способа по изобретению на основе двух гомодимерных белков, содержащих только несколько фактически консервативных асимметричных мутаций в СНЗ-участках.

Так, в одном воплощении последовательности указанных первого и второго СНЗ-участков содержат замены аминокислот в неидентичных позициях.

Аминокислотные заместители могут представлять собой природные аминокислоты или неприродные аминокислоты. Примерами неприродных аминокислот являются, например, аминокислоты, раскрытых в Xie J. and Schultz P.G., *Current Opinion in Chemical Biology* (2005), 9: 548-554, и Wang Q. et al., *Chemistry & Biology* (2009), 16: 323-336.

В одном воплощении аминокислоты представляют собой природные аминокислоты.

В одном воплощении указанный первый гомодимерный белок имеет не более одной замены аминокислот в СНЗ-участке, и второй гомодимерный белок имеет не более одной замены аминокислот в СНЗ-участке относительно СНЗ-участков дикого типа.

В одном воплощении первый гомодимерный белок имеет замену аминокислоты в позиции, выбранной из группы, состоящей из позиций 366, 368, 370, 399, 405, 407 и 409, и указанный второй гомодимерный белок имеет замену аминокислоты в позиции, выбранной из группы, состоящей из позиций 366, 368, 370, 399, 405, 407 и 409, и при этом указанный первый гомодимерный белок и указанный второй гомодимерный белок не заменяются в одних и тех же позициях.

В одном воплощении первый гомодимерный белок имеет замену аминокислоты в позиции 366, и указанный второй гомодимерный белок имеет замену аминокислоты в позиции, выбранной из группы, состоящей из позиций 368, 370, 399, 405, 407 и 409. В одном воплощении аминокислоту в позиции 366 выбирают из Arg, Lys, Asn, Gln, Tyr, Glu и Gly.

В одном воплощении первый гомодимерный белок имеет замену аминокислоты в позиции 368, и указанный второй гомодимерный белок имеет замену аминокислоты в позиции, выбранной из группы, состоящей из позиций 366, 370, 399, 405, 407 и 409.

В одном воплощении первый гомодимерный белок имеет замену аминокислоты в позиции 370, и указанный второй гомодимерный белок имеет замену аминокислоты в позиции, выбранной из группы, состоящей из позиций 366, 368, 399, 405, 407 и 409.

В одном воплощении первый гомодимерный белок имеет замену аминокислоты в позиции 399, и указанный второй гомодимерный белок имеет замену аминокислоты в позиции, выбранной из группы, состоящей из позиций 366, 368, 370, 405, 407 и 409.

В одном воплощении первый гомодимерный белок имеет замену аминокислоты в позиции 405, и указанный второй гомодимерный белок имеет замену аминокислоты в позиции, выбранной из группы, состоящей из позиций 366, 368, 370, 399, 407 и 409.

В одном воплощении первый гомодимерный белок имеет замену аминокислоты в позиции 407, и указанный второй гомодимерный белок имеет замену аминокислоты в позиции, выбранной из группы, состоящей из позиций 366, 368, 370, 399, 405 и 409.

В одном воплощении первый гомодимерный белок имеет замену аминокислоты в позиции 409, и указанный второй гомодимерный белок имеет замену аминокислоты в позиции, выбранной из группы, состоящей из позиций 366, 368, 370, 399, 405 и 407.

Соответственно, в одном воплощении последовательности указанных первого и второго СНЗ-участков содержат асимметричные мутации, т.е. мутации в различных позициях в двух СНЗ-участках, например мутацию в позиции 405 в одном из СНЗ-участков и мутацию в позиции 409 в другом СНЗ-участке.

В одном воплощении первый гомодимерный белок имеет аминокислоту в позиции 409 иную, чем

В другом воплощении указанный первый гомодимерный белок имеет Туг в позиции 407 и Arg в позиции 409, и указанный второй гомодимерный белок имеет Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val или Тгр в позиции 407 и Lys в позиции 409.

В другом воплощении указанный первый гомодимерный белок имеет Туг в позиции 407 и Arg в позиции 409, и указанный второй гомодимерный белок имеет Gly, Leu, Met, Asn или Тгр в позиции 407 и Lys в позиции 409.

В одном воплощении первый гомодимерный белок имеет в позиции 409 аминокислоту иную, чем Lys, Leu или Met, и второй гомодимерный белок имеет

(i) аминокислоту иную, чем Phe, Leu и Met в позиции 368, или

(ii) Тгр в позиции 370, или

(iii) аминокислоту иную, чем Asp, Cys, Pro, Glu или Gln в позиции 399.

В одном воплощении первый гомодимерный белок имеет в позиции 409 Arg, Ala, His или Gly, и второй гомодимерный белок имеет

(i) Lys, Gln, Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Asn, Arg, Ser, Thr, Val или Тгр в позиции 368, или

(ii) Тгр в позиции 370, или

(iii) Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, Trp, Phe, His, Lys, Arg или Туг в позиции 399.

В одном воплощении первый гомодимерный белок имеет Arg в позиции 409, и второй гомодимерный белок имеет

(i) Asp, Glu, Gly, Asn, Arg, Ser, Thr, Val или Тгр в позиции 368, или

(ii) Тгр в позиции 370, или

(iii) Phe, His, Lys, Arg или Туг в позиции 399.

Кроме вышеуказанных замен аминокислот указанные первый и второй гомодимерные белки могут содержать другие замены, делеции или вставки аминокислот относительно Fc-последовательностей дикого типа.

В первом воплощении указанные первый и второй CH3-участки, за исключением специфических мутаций, включают последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 (IgG1m(a)):

SEQ ID NO: 1:

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

В другом воплощении указанные первый и второй CH3-участки, за исключением специфических мутаций, включают последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2 (IgG1m(f)):

SEQ ID NO: 2:

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSGSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

В другом воплощении указанные первый и второй CH3-участки, за исключением специфических мутаций, включают последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 (IgG1m(ax)):

SEQ ID NO: 3:

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSGSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK

В других воплощениях предоставляемые гомодимерные белки могут представлять собой крысиное антитело и мышинное антитело, которые показывают предпочтительное образование пары, как описано в Lindhofer et al. (1995), J. Immunol., 155: 219 (см. выше), или так называемые варианты антител выступ-в-ямку, как описано в патенте США 5731168 (см. выше). Однако в некоторых случаях последние гомодимерные исходные белки могут быть более трудными для получения из-за слишком слабых гомодимерных взаимодействий CH3-CH3. Таким образом, описанные в данном описании варианты с мутациями в позициях 350, 370, 405 и 409, могут быть предпочтительными.

Последовательность шарнирного участка гомодимерных исходных белков может изменяться. Однако при некоторых обстоятельствах полученный гетеродимерный белок может быть более устойчивым, если шарнирный участок не является IgG4-подобным, и предпочтительно является IgG1-подобным.

Так, в одном воплощении ни указанный первый ни указанный второй гомодимерный белок не включает последовательность Cys-Pro-Ser-Cys в (коровом) шарнирном участке.

В другом воплощении как указанный первый, так и указанный второй гомодимерный белок включают последовательность Cys-Pro-Ser-Cys в (коровом) шарнирном участке.

Во многих воплощениях, в которых первый и указанный второй гомодимерные белки представляют собой антитела, указанные антитела также включают легкую цепь. Как пояснялось выше, указанные легкие цепи могут быть различными, т.е. различаться в последовательности, и каждая образует функциональный антигенсвязывающий домен только с одной из тяжелых цепей. Однако в другом воплощении указанные первый и второй гомодимерные белки представляют собой тяжелоцепочечные антитела, которые не нуждаются в легкой цепи для связывания антигена, см., например, Hamers-Casterman (1993), Nature, 363:446.

Как описано выше, стадия с) способа по изобретению включает инкубацию указанного первого белка вместе с указанным вторым белком в условиях восстановления, достаточных для того, чтобы по-

зволить цистеинам в шарнирном участке претерпевать изомеризацию дисульфидных связей. Примеры подходящих условий приводятся в данном описании. Минимальные требования к цистеинам в шарнирном участке для того, чтобы претерпевать изомеризацию дисульфидных связей, могут различаться в зависимости от гомодимерных исходных белков, в частности в зависимости от точной последовательности в шарнирном участке. Важно, что соответственные гомодимерные взаимодействия указанных первых и вторых СНЗ-участков достаточно слабые для того, чтобы позволить цистеинам в шарнирном участке претерпевать изомеризацию дисульфидных связей в данных условиях.

В одном воплощении условия восстановления на стадии с) включают добавление восстановителя, например, восстановителя, выбранного из группы, включающей 2-меркаптоэтиламин (2-MEA), дитиотреитол (DTT), дитиозритреитол (DTE), глутатион, трис(2-карбоксиил)фосфин (ТСЕР), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол, предпочтительно, восстановитель выбирают из группы, включающей 2-меркаптоэтиламин, дитиотреитол и трис(2-карбоксиил)фосфин.

В одном воплощении условия восстановления, дающие возможность регулируемого обмена Fab-фрагментами, описываются в плане требуемого окислительно-восстановительного потенциала. Трипептид глутатион (GSH) является основным низкомолекулярным тиолом в клетках и регулирует окислительно-восстановительное состояние тиол-дисульфид, которое существенно для нормальной передачи сигнала окисления-восстановления *in vivo*. Динамика клеточного окислительно-восстановительного баланса достигается поддержанием состояния тиол-дисульфид восстановленного GSH и его окисленной формы GSSG. Величины восстановительного потенциала можно измерить как описано в Rost and Rapoport, *Nature*, 201: 185 (1964), и Aslund et al., *J. Biol. Chem.*, 272: 30780-30786 (1997). Окислительно-восстановительный потенциал E_h , который учитывает стехиометрию два окисленных GSH на GSSG, является количественной мерой для состояния окисления-восстановления. E_h вычисляют по уравнению Нернста

$$E_h = E_o + (RT/nF) \ln ([GSSG \text{ (окис)}] / [GSH \text{ (восст)}]^2).$$

E_o представляет собой стандартный потенциал для окислительно-восстановительной пары при определенном pH, R представляет собой газовую постоянную, T представляет собой абсолютную температуру, F представляет собой постоянную Фарадея, и n представляет собой число переносимых электронов. Оценки E_h *in vivo* для пары GSH/GSSG находятся в интервале от -260 до -200 мВ (Aw T., *News Physiol. Sci.*, 18: 201-204 (2003)). Окончательно дифференцированные клетки в соответствии с этим сохраняют E_h порядка -200 мВ, в то время как активно профилирующиеся клетки поддерживают более низкий E_h приблизительно в -260 мВ.

Стандартный окислительно-восстановительный потенциал для DTT равен -330 мВ (Cleland et al., *Biochemistry*, 3: 480-482 (1964)). Показано, что ТСЕР восстанавливает DTT в растворе и, следовательно, имеет более отрицательный окислительно-восстановительный потенциал, чем DTT. Однако точная величина не сообщается. Условия восстановления, дающие возможность регулировать условия обмена Fab-фрагментами, поэтому можно описать в плане требуемого окислительно-восстановительного потенциала E_h , который оптимально ниже величины, которая достигается при нормальных условиях в плазме *in vivo*, и которая представляет собой вышеуказанный окислительно-восстановительный потенциал, который восстанавливает дисульфидные связи антитела кроме связей, локализованных в шарнирном участке и вовлеченных в образование дисульфидных связей между тяжелыми цепями.

Так, в другом воплощении стадию с) выполняют в условиях восстановления с окислительно-восстановительным потенциалом, колеблющимся на уровне ниже -50 мВ, таком как ниже -150 мВ, предпочтительно, ниже -150 и до -600 мВ, таком как от -100 до -500 мВ, предпочтительнее, от -250 до -450 мВ, таком как от -250 до -400 мВ, даже предпочтительнее, от -200 до -300 мВ.

В другом воплощении стадия с) включает инкубацию в течение, по меньшей мере, 90 мин при температуре, по меньшей мере, 20°C в присутствии, по меньшей мере, 25 мМ 2-меркаптоэтиламина или в присутствии, по меньшей мере, 0,5 мМ дитиотреитола. Инкубацию можно выполнять при pH от 5 до 8, например, при pH 7,0 или при pH 7,4.

В другом воплощении стадия с) включает восстановление условий для отсутствия восстановления и меньшего восстановления, например, путем удаления восстановителя, например, путем обессоливания.

В некоторых воплощениях способ по изобретению дает продукт антитела, в котором более 80%, например, более 90%, например, более 95%, например, более 99% молекул антител являются нужными биспецифическими антителами.

Последующая обработка является более гибкой и легкой для регулирования по сравнению со способами известного уровня техники, основанными на коэкспрессии.

Характер последующей обработки при получении биспецифических антител обменом Fab-фрагментами в условиях восстановления (таких как добавление 2-MEA), как раскрывается в данном описании, делает его весьма подходящей стратегией для (высокопроизводительного) скрининга многочисленных комбинаций специфичностей для обнаружения биспецифических антител. Кроме того, *in vitro* способ можно выполнить в лаборатории, что дает возможность для большего регулирования, гибкости и выхода гетеродимерного белка, чем это позволяет коэкспрессия. Дополнительным преимуществом такой стратегии является то, что скрининг можно осуществить в конечном терапевтическом формате, устраняя

необходимость конструирования после отбора.

Как поясняется выше, в другом аспекте способ по изобретению можно использовать для "матричного" скрининга, т.е. для получения большого числа различных комбинаций специфичностей связывания на основе двух наборов антител, причем один набор имеет идентичные первые СНЗ-участки, и другой набор имеет идентичные вторые СНЗ-участки, при этом последовательности указанных первых и вторых СНЗ-участков являются различными и таковы, что гетеродимерное взаимодействие между указанными первыми и вторыми СНЗ-участками сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанных первых и вторых СНЗ-участков.

Таким образом, в одном воплощении изобретение относится к способу отбора гетеродимерного белка с нужным свойством, причем указанный способ включает стадии:

- a) предоставления первого набора гомодимерных белков, включающих Fc-участок, при этом гомодимерные белки имеют идентичные СНЗ-участки,
- b) предоставления второго набора гомодимерных белков, включающих Fc-участок, при этом гомодимерные белки имеют идентичные СНЗ-участки, при этом последовательности указанных первых и вторых СНЗ-участков являются различными и таковы, что гетеродимерное взаимодействие между указанными первыми и вторыми СНЗ-участками сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанных первых и вторых СНЗ-участков,
- c) инкубации гомодимерных белков из указанного первого набора и указанного второго набора в условиях восстановления, достаточных для возможности для цистеинов в шарнирном участке претерпевать изомеризацию дисульфидных связей, причем таким образом образуется набор биспецифических антител,
- d) необязательно, возврат к невозстанавливающим условиям,
- e) анализа полученного набора гетеродимерных белков на заданное нужное свойство, и
- f) отбора гетеродимерного белка с нужным свойством.

В одном воплощении изобретение относится к способу отбора биспецифического антитела с нужным свойством, причем указанный способ включает стадии:

- a) предоставления первого набора гомодимерных антител, включающих антитела с различными вариabельными участками, при этом указанные антитела из указанного первого набора включают идентичные СНЗ-участки,
- b) предоставления второго набора гомодимерных антител, включающих антитела с различными вариabельными участками или идентичными вариabельными участками, при этом указанные антитела из указанного второго набора включают идентичные СНЗ-участки, при этом последовательности указанных первых и вторых СНЗ-участков являются различными и таковы, что гетеродимерное взаимодействие между указанными первыми и вторыми СНЗ-участками сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанных первых и вторых СНЗ-участков,
- c) инкубации комбинаций антител из указанного первого набора и указанного второго набора в условиях восстановления, достаточных для возможности для цистеинов в шарнирном участке претерпевать изомеризацию дисульфидных связей, причем таким образом образуется набор биспецифических антител,
- d) необязательно, возврат к невозстанавливающим условиям,
- e) анализа полученного набора биспецифических антител на заданное нужное свойство, и
- f) отбора биспецифического антитела с нужным свойством.

В одном воплощении гомодимерные антитела из второго набора имеют различные вариabельные участки.

В одном воплощении гомодимерные антитела из второго набора имеют идентичные вариabельные участки, но имеют различные аминокислотные или структурные вариации вне антигенсвязывающего участка.

Два набора можно составить многими различными способами как желательнo. Так, два набора можно нацелить на один и тот же эпитоп или различные эпитопы на одном и том же антигене. Два набора также можно нацелить на различные антигены, и каждый набор может содержать антитела, связывающиеся с одним и тем же эпитопом или различными эпитопами на рассматриваемом антигене. Кроме того, один из наборов или оба набора могут содержать антитела, имеющие целью различные антигены.

В другом воплощении указанным нужным свойством является уничтожение клеток, лизис клеток, ингибирование клеточной пролиферации или связывание с клетками, экспрессирующими оба антигена-мишени.

Стратегия скрининга включает две панели векторов кодирующих антител, с различными специфичностями, где одна панель клонируется в остов, который способен участвовать в обмене Fab-фрагментами в условиях восстановления (таких как добавление 2-МЕА) с остовами антител второй панели. Например, первую панель клонируют в остов IgG1-F405L, и вторую панель клонируют в остов IgG1-K409R (о других возможных комбинациях остовов см. также примеры 19, 28, 29, 30, 35, 36, 37, 38 и 39).

Каждый член двух панелей векторов кодирующих антитела затем экспрессируется по отдельности в небольшом масштабе. Например, векторы, кодирующие антитела, временно трансфицируются в клетки НЕК293 и экспрессируются в 2,3-мл культурах в 24-луночных планшетах. С другой стороны, можно ис-

пользовать другие подходящие (малого масштаба) системы получения, известные в технике.

Затем экспрессированные антитела двух панелей антител смешивают попарно в эквимоллярных соотношениях как в матрице. Например, отдельные антитела очищают хроматографией с белком А в малом масштабе, и концентрацию антител измеряют поглощением при длине волны 280 нм. С другой стороны, можно использовать другие подходящие (в малом масштабе) способы очистки или способы определения концентрации белка, известные в технике. В другом воплощении стадия очистки может быть исключена, если на дальнейшие применения не влияет экспрессионная среда. Затем концентрации антител нормализуют таким образом, что подходящий объем содержит эквимоллярные количества обоих антител. Например, панель из 8 антител в остова с F405L смешивают по отдельности с 8 антителами в остова с K409R таким образом, что 64 смеси по 100 мкл содержат 80 мкг/мл антитела А (F405L) и 80 мкг/мл антитела В (K409R). С другой стороны, если стратегия содержит последующую стадию специфической очистки биспецифических антител, стадия нормализации количества антител может быть исключена.

К смесям антител добавляют подходящее количество восстановителя и проводят инкубацию в течение подходящего периода времени при рекомендованной температуре. Например, к 100 мкл смеси, содержащей 80 мкг/мл антитела А (F405L) и 80 мкг/мл антитела В (K409R), добавляют 25 мкл 125 мМ раствора 2-МЕА (конечная концентрация 25 мМ 2-МЕА) и проводят инкубацию в течение ночи при 25°C.

Вслед за этим восстановитель удаляют из смесей (содержащих теперь биспецифические антитела) для промотирования окисления дисульфидных связей и для того, чтобы избежать влияния восстановителя в процессе скрининг анализа. Например, 2-МЕА удаляют, выполняя буферный обмен 64 смесей с использованием 96-луночных планшетов для обессоливания Zeba Spin (Pierce Biotechnology, #89807). С другой стороны, можно использовать другие подходящие способы для удаления восстановителя, известные в технике.

Затем биспецифические антитела характеризуют биохимически или функционально для идентификации ведущих кандидатов. Например, 64 биспецифических антитела оценивают на ингибирование пролиферации подходящих клеточных линий или связывание с подходящими клеточными линиями. Идентифицированные ведущие кандидаты затем получают в более крупном масштабе и характеризуют подробнее.

Получение путем коэкспрессии.

Гетеродимерные белки по изобретению также можно получить коэкспрессией конструкций, кодирующих первый и второй полипептиды в одной клетке.

Таким образом, в первом аспекте изобретение относится к способу получения гетеродимерного белка, причем указанный способ включает следующие стадии:

а) предоставление первой нуклеотидной конструкции, кодирующей первый полипептид, включающий первый Fc-участок иммуноглобулина, при этом указанный первый Fc-участок включает первый СНЗ-участок,

б) предоставление второй нуклеотидной конструкции, кодирующей второй полипептид, включающий второй Fc-участок иммуноглобулина, при этом указанный второй Fc-участок включает второй СНЗ-участок, при этом последовательности указанных первого и второго СНЗ-участков являются различными и таковы, что гетеродимерное взаимодействие между указанными первым и вторым СНЗ-участками сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанных первого и второго СНЗ-участков, и при этом указанный первый гомодимерный белок имеет в позиции 409 аминокислоту иную, чем Lys, Leu или Met, и указанный второй гомодимерный белок имеет замену аминокислоты в позиции, выбранной из группы, включающей позиции 366, 368, 370, 399, 405 и 407, и/или при этом последовательности указанных первого и второго СНЗ-участков таковы, что константы диссоциации гомодимерных взаимодействий каждого из СНЗ-участков составляют от 0,01 до 10 микромоляр, например от 0,05 до 10 микромоляр, предпочтительнее от 0,01 до 5 микромоляр, например от 0,05 до 5 микромоляр, даже предпочтительнее от 0,01 до 1 микромоляр, например от 0,05 до 1 микромоляр, от 0,01 до 0,5 или от 0,01 до 0,1 микромоляр, когда анализируются так, как описано в примере 21,

с) коэкспрессия указанных первой и второй нуклеотидных конструкций в клетке-хозяине, и

д) получение указанного гетеродимерного белка из клеточной культуры. Подходящие экспрессирующие векторы, включая промоторы, энхансеры и т.д., и подходящие клетки-хозяева для получения антител хорошо известны в технике. Примеры клеток-хозяев включают дрожжевые и бактериальные клетки и клетки млекопитающих, такие как клетки CHO или НЕК.

В одном воплощении такого способа указанный первый СНЗ-участок имеет в позиции 409 аминокислоту иную, чем Lys, Leu или Met, и указанный второй СНЗ-участок имеет аминокислоту иную, чем Phe, в позиции 405, и/или последовательности указанных первого и второго СНЗ-участков таковы, что константы диссоциации гомодимерных взаимодействий каждого из СНЗ-участков составляют от 0,01 до 10 микромоляр, например от 0,05 до 10 микромоляр, предпочтительнее от 0,01 до 5 микромоляр, например от 0,05 до 5 микромоляр, даже предпочтительнее от 0,01 до 1 микромоляр, например от 0,05 до 1 микромоляр, от 0,01 до 0,5 или от 0,01 до 0,1 микромоляр, когда анализируются так, как описано в примере 21.

В другом воплощении такого способа указанный первый СНЗ-участок имеет в позиции 409 аминокис-

кислоту иную, чем Lys, Leu или Met, и указанный второй СНЗ-участок имеет аминокислоту иную, чем Phe, в позиции 405, например, иную чем Phe, Arg или Gly в позиции 405, или указанный первый СНЗ-участок имеет в позиции 409 аминокислоту иную, чем Lys, Leu или Met, и указанный второй СНЗ-участок имеет аминокислоту иную, чем Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser или Thr в позиции 407.

В некоторых воплощениях указанные первый и второй полипептиды представляют собой полно-размерные тяжелые цепи двух антител, которые связывают различные эпитопы (т.е. указанные первая и вторая нуклеотидные конструкции кодируют полноразмерные тяжелые цепи двух антител, которые связывают различные эпитопы), и таким образом, гетеродимерный белок представляет собой биспецифическое антитело. Такое биспецифическое антитело может представлять собой тяжелоцепочечное антитело, или указанная клетка-хозяин также может экспрессировать одну или несколько нуклеотидных конструкций, кодирующих легкую цепь. Если с тяжелоцепочечными конструкциями коэкспрессируется только одна легкоцепочечная конструкция, тогда функциональное биспецифическое антитело образуется только если последовательность легкой цепи такова, что она может образовывать функциональный антигенсвязывающий домен с каждой из тяжелых цепей. Если с тяжелоцепочечными конструкциями коэкспрессируются две или больше различных легкоцепочечных конструкций, будет образовываться несколько продуктов.

В других воплощениях способ коэкспрессии по изобретению включает любую из других особенностей, описанных выше в способе *in vitro*.

В другом аспекте изобретение относится к экспрессирующему вектору, включающему первую и вторую нуклеотидные конструкции, описанные в данном описании выше. В еще одном аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, включающей первую и вторую нуклеотидные конструкции, описанные в данном описании выше.

Гетеродимерные белки.

В другом аспекте изобретение относится к гетеродимерному белку, полученному или который можно получить способом по изобретению.

Кроме того, способ по изобретению создает возможность для образования асимметричных молекул, молекул с различными характеристиками каждого из Fab-фрагментов или каждого из СНЗ-доменов или молекул с отличающимися модификациями в молекулах, например, молекулы с заменой(ами) аминокислоты(аминокислот) на неприродную(ые) для конъюгации. Такие асимметричные молекулы можно получать любыми подходящими комбинациями. Это также поясняется ниже некоторыми неограничительными примерами.

Биспецифические антитела можно использовать для предварительного нацеливания на клетку-мишень, представляющую интерес, в том числе, но без ограничения, на опухолевую клетку. Предварительное нацеливание на клетку-мишень можно использовать для исследований с визуализацией или для целей иммунотерапии.

В одном воплощении способа по изобретению первый Fab-фрагмент биспецифической молекулы связывается с опухолевой клеткой, такой как белок на поверхности опухолевой клетки или углевод на поверхности опухолевой клетки, например, одним из белков на поверхности опухолевой клетки, перечисленных в данном описании, и второй Fab-фрагмент узнает радиоактивную эффекторную молекулу, в том числе, но без ограничения, радиоактивную метку, в сочетании или соединенную (через хелатор) с пептидом или гаптеном. Примером такого меченного радиоактивной меткой пептида является меченная индием диэтилентриаминпентауксусная кислота (anti-DPTA(In), van Schaijk et al, Clin. Cancer Res., 2005, 11: 7230s-7126s). Другим примером является использование коллоидных частиц меченного гаптена, таких как липосомы, наночастицы полимерных мицелл, содержащих радионуклеиды, такие как, например, технеций-99 (Jestin et al., Q J.Nucl. Med. Mol. Imaging, 2007, 51: 51-60).

В другом воплощении используют другую связанную с гаптеном цитостатическую молекулу, такую как токсин.

В другом воплощении способа по изобретению первый Fab-фрагмент биспецифической молекулы гликозилирован в позиции N297 (нумерация EU), и второй Fab-фрагмент биспецифической молекулы является агликозилированным (негликозилирован, например, путем мутирования N297 в мутацию Q или A или E (Bolt S. et al., Eur. J. Immunol., 1993, 23: 403-411)). Асимметричное гликозилирование в Fc-участке оказывает воздействие на антителозависимое цитотоксическое действие антитела на клетку (Ha et al., Glycobiology, 2011, April, 5), а также на взаимодействие с молекулами с другими эффекторными функциями, такие как Clq.

В другом воплощении способа по изобретению первый Fab-фрагмент биспецифической молекулы взаимодействует с FcRn - неонатальным Fc-рецептором (Roopenian D.C. et al., Nat. Rev. Immunol., 2007, 7: 715-725), и у второго Fab-фрагмента ухудшено связывание с FcRn за счет мутации сайта взаимодействия с FcRn на молекулах, например, путем создания мутации H435A (Shields R.L. et al., J. Biol. Chem., 2001; Firan M. et al., Int. Immunol., 2001).

В другом воплощении способа по изобретению первый Fab-фрагмент биспецифической молекулы взаимодействует со стафилококковым белком A (белок A, Deisenhofer et al., Biochemistry, 20, 2361-2370 (1981)) и стрептококковым белком G (белок G, Derrick et al., Nature, 359, 752-754 (1992)), часто исполь-

зумыми для очистки антител, и у второго Fab-фрагмента биспецифической молекулы ухудшено взаимодействие с белком А или G. В результате удаление остаточных количеств гомодимера с ухудшенным связыванием белка А или G после обмена до гетеродимера легко осуществляется путем очистки биспецифических молекул с помощью белка А или G.

В другом воплощении связывание с любым из Fc γ -рецепторов или FcRn улучшается или снижается на одном из двух Fab-фрагментов биспецифической молекулы.

В другом воплощении связывание с Clq улучшается или снижается на одном из двух Fab-фрагментов биспецифической молекулы.

В другом воплощении белок создают для усиления активации комплемента на одном или двух Fab-фрагментах молекулы.

В другом воплощении каждый из Fab-фрагментов, присутствующих в биспецифической молекуле, получают из IgG различных подклассов.

В другом воплощении каждый из Fab-фрагментов, присутствующих в биспецифической молекуле, содержит различные аллотипические мутации (Jefferis & Lefranc, 2009, MABs, 1: 332-8).

В другом воплощении другую категорию асимметричных иммунотерапевтических молекул получают путем замены Fab одного из Fab-фрагментов биспецифической молекулы иммуноактивным, стимулирующим или ингибирующим цитокином. Неограниченными примерами таких цитокинов являются IL-2, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α , G-CSF, GM-CSF, IL-10, IL-4, IL-6, IL-13. С другой стороны, в молекулы включается фактор (роста) или гормоностимулятор или ингибитор.

В другом воплощении Fab одного из Fab-фрагментов заменяют литическим пептидом, т.е. пептидами, которые способны лизировать опухолевые клетки, бактерии, грибы и т.д., в том числе, но без ограничения, антимикробными пептидами, подобными маганину, меллитину, цекропину, KLAKKLAK и его вариантам (Schweizer et al., Eur. J. Pharmacology, 2009, 625: 190-194; Javadpour, J. Med. Chem., 1996, 39: 3107-3113; Marks et al., Cancer Res., 2005, 65: 2373-2377; Rege et al., Cancer Res., 2007, 67: 6368-6375) или катионными литическими пептидами (технология CLYP, US 2009/0269341).

В другом воплощении один или оба Fab Fab-фрагментов заменяют рецепторами для цитокинов и/или факторов роста, создавая так называемые рецепторы-приманки, из которых хорошо известными примерами являются энбрел® (Enbrel®) (этанерцепт), направляющий на TNF- α , и VEGF-ловушка, направляющая на VEGF. Объединение таких двух рецепторов-приманок в одну молекул показывает активность, превосходящую отдельные рецепторы-приманки (Jung, J. Biol. Chem., 2011, 286: 14410-14418).

В другом воплощении другую категорию асимметричных иммунотерапевтических молекул получают путем слияния иммуноактивных, стимулирующих или ингибирующих цитокинов с N-концом или C-концом одного или обоих Fab-фрагментов, присутствующих в биспецифической молекуле. Это может положительно повлиять на противоопухолевую активность биспецифической молекулы. Примерами таких молекул, однако не ограниченными перечисленным ниже, являются IL-2 (Fournier et al., 2011, Int. J. Oncology, doi: 10.3892/ijo.2011.976), IFN- α , IFN- β или IFN- γ (Himm et al., 2007, J. Immunol. 179:6881-6888; Rossie et al., 2009, Blood, 114: 3864-3871), TNF- α . С другой стороны, N-концевое или C-концевое слияние цитокинов, таких как, например, G-CSF, GM-CSF, IL-10, IL-4, IL-6 или IL-13, может положительно повлиять на эффекторную функцию молекулы антитела. С другой стороны, в молекулы по N-концу или C-концу включается фактор (роста) или гормоностимулятор или ингибитор.

В другом воплощении усилить активность молекулы может слияние одного или обоих Fab-фрагментов по N-концу или C-концу с литическим пептидом, таким как, например, антимикробные пептиды, подобные маганину, меллитину, цекропину, KLAKKLAK и его вариантам (Schweizer et al., Eur. J. Pharmacology, 2009, 625: 190-194; Javadpour, J. Med. Chem., 1996, 39: 3107-3113; Marks et al., Cancer Res., 2005, 65: 2373-2377; Rege et al., Cancer Res., 2007, 67: 6368-6375), или катионные литические пептиды (технология CLYP, US 2009/0269341).

В другом воплощении другая категория асимметричных иммунотерапевтических молекул представляет собой моновалентные антитела, молекулы которых взаимодействуют с одним Fab-фрагментом для выбора мишени. В такой молекуле один из Fab-фрагментов, присутствующих в биспецифической молекуле, направлен против выбранной молекулы-мишени, второй Fab-фрагмент молекулы не содержит Fab или не имеет связывающего/функционального Fab, как описано для MetMab (Genetech, WO 96/38557). С другой стороны, можно получить мономерные Fc-слитые белки, такие как описанные для фактора VIIIХ (Peters et al., Blood, 2010, 115: 2057-2064).

С другой стороны, способом по изобретению можно получать комбинации любых из вышеуказанных асимметричных молекул.

В еще одном аспекте изобретение относится к гетеродимерному белку, включающему первый полипептид, включающий первый Fc-участок иммуноглобулина, причем указанный первый Fc-участок включает первый СН3-участок, и второй полипептид, включающий второй Fc-участок иммуноглобулина, причем указанный второй Fc-участок включает второй СН3-участок, при этом последовательности указанных первого и второго СН3-участков различаются и таковы, что гетеродимерное взаимодействие между указанными первым и вторым СН3-участками сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий.

ствий указанных первого и второго СНЗ-участков, и при этом указанный первый гомодимерный белок имеет в позиции 409 аминокислоту иную, чем Lys, Leu или Met, и указанный второй гомодимерный белок имеет замену аминокислоты в позиции, выбранной из группы, включающей позиции 366, 368, 370, 399, 405 и 407, и/или при этом последовательности указанных первого и второго СНЗ-участков таковы, что константы диссоциации гомодимерных взаимодействий каждого из СНЗ-участков составляют от 0,01 до 10 микромоляр, например от 0,05 до 10 микромоляр, предпочтительнее от 0,01 до 5 микромоляр, например от 0,05 до 5 микромоляр, даже предпочтительнее от 0,01 до 1 микромоляр, например от 0,05 до 1 микромоляр, от 0,01 до 0,5 или от 0,01 до 0,1 микромоляр, когда анализируются так, как описано в примере 21.

В одном воплощении указанный первый СНЗ-участок имеет в позиции 409 аминокислоту иную, чем Lys, Leu или Met, и указанный второй СНЗ-участок имеет аминокислоту иную, чем Phe, в позиции 405, и/или последовательности указанных первого и второго СНЗ-участков таковы, что константы диссоциации гомодимерных взаимодействий каждого из СНЗ-участков составляют от 0,01 до 10 микромоляр, например от 0,05 до 10 микромоляр, предпочтительнее от 0,01 до 5 микромоляр, например от 0,05 до 5 микромоляр, даже предпочтительнее от 0,01 до 1 микромоляр, например от 0,05 до 1 микромоляр, от 0,01 до 0,5 или от 0,01 до 0,1 микромоляр, когда анализируются так, как описано в примере 21.

В другом воплощении гетеродимерного белка указанный первый СНЗ-участок имеет в позиции 409 аминокислоту иную, чем Lys, Leu или Met, и указанный второй СНЗ-участок имеет аминокислоту иную, чем Phe, в позиции 405, например, иную чем Phe, Arg или Gly в позиции 405, или указанный первый СНЗ-участок имеет в позиции 409 аминокислоту иную, чем Lys, Leu или Met, и указанный второй СНЗ-участок имеет аминокислоту иную, чем Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser или Thr в позиции 407.

В других воплощениях гетеродимерный белок по изобретению включает любую из других особенностей, описанных выше для способов получения.

Так, в другом воплощении гетеродимерного белка по изобретению указанный первый полипептид представляет собой полноразмерную тяжелую цепь антитела, предпочтительно, человеческого антитела.

В другом воплощении гетеродимерного белка по изобретению указанный второй полипептид представляет собой полноразмерную тяжелую цепь антитела, предпочтительно, человеческого антитела.

В другом воплощении гетеродимерного белка по изобретению указанные первый и второй полипептиды представляют собой полноразмерные тяжелые цепи двух антител, предпочтительно, двух человеческих антител, которые связывают различные эпитопы, и таким образом, гетеродимерный белок представляет собой биспецифическое антитело. Такое биспецифическое антитело может представлять собой тяжелоцепочечное антитело, или антитело, которое кроме тяжелых цепей включает две полноразмерные легкие цепи, которые могут быть одинаковыми или различными.

В другом воплощении гетеродимерного белка по изобретению Fc-участок первого полипептида из изоформа, выбранного из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 (за исключением установленных мутаций), и Fc-участок второго полипептида из изоформа, выбранного из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 (за исключением установленных мутаций).

В другом воплощении гетеродимерного белка по изобретению Fc-участки обоих указанного первого и указанного второго полипептидов являются участками изоформа IgG1.

В другом воплощении гетеродимерного белка по изобретению один из Fc-участков указанных полипептидов из изоформа IgG1 и другой из изоформа IgG4.

В другом воплощении гетеродимерного белка по изобретению повышенная сила гетеродимерного взаимодействия по сравнению с каждым из гомодимерных взаимодействий имеет место из-за модификаций СНЗ иных, чем введение ковалентных связей, цистеиновых остатков или заряженных остатков.

В другом воплощении гетеродимерного белка по изобретению гетеродимерное взаимодействие между указанными первым и вторым полипептидами в гетеродимерном белке таково, что обмен Fab-фрагментами может происходить при 0,5 мМ GSH в условиях, описанных в примере 13.

В другом воплощении гетеродимерного белка по изобретению гетеродимерное взаимодействие между указанными первым и вторым полипептидами в полученном гетеродимерном белке таково, что обмена Fab-фрагментами у мышей *in vivo* не происходит в условиях, описанных в примере 14.

В другом воплощении гетеродимерного белка по изобретению указанный первый СНЗ-участок включает Phe в позиции 405 и в позиции 409 аминокислоту иную, чем Lys, Leu или Met, и указанный второй СНЗ-участок включает в позиции 405 аминокислоту иную, чем Phe, и Lys в позиции 409.

В другом воплощении гетеродимерного белка по изобретению указанный первый СНЗ-участок включает Phe в позиции 405 и в позиции 409 аминокислоту иную, чем Lys, Leu или Met, и указанный второй СНЗ-участок включает Leu в позиции 405 и Lys в позиции 409.

В другом воплощении гетеродимерного белка по изобретению указанный первый СНЗ-участок включает Phe в позиции 405 и Arg в позиции 409, и указанный второй СНЗ-участок включает Leu в позиции 405 и Lys в позиции 409.

В другом воплощении гетеродимерного белка по изобретению указанный первый СНЗ-участок включает в позиции 409 аминокислоту иную, чем Lys, Leu или Met, и указанный второй СНЗ-участок включает и Lys в позиции 409 и а) He в позиции 350 и Leu в позиции 405 или б) Thr в позиции 370 и Leu в позиции 405.

В другом воплощении гетеродимерного белка по изобретению указанный первый СНЗ-участок включает Arg в позиции 409, и указанный второй СНЗ-участок включает Lys в позиции 409 и а) He в позиции 350 и Leu в позиции 405 или б) Thr в позиции 370 и Leu в позиции 405.

В другом воплощении гетеродимерного белка по изобретению указанный первый СНЗ-участок включает Thr в позиции 350, Lys в позиции 370, Phe в позиции 405 и Arg в позиции 409, и указанный второй СНЗ-участок включает Lys в позиции 409 и а) He в позиции 350 и Leu в позиции 405 или б) Thr в позиции 370 и Leu в позиции 405.

В другом воплощении гетеродимерного белка по изобретению указанный первый СНЗ-участок включает Thr в позиции 350, Lys в позиции 370, Phe в позиции 405 и Arg в позиции 409, и указанный второй СНЗ-участок включает He в позиции 350, Thr в позиции 370, Leu в позиции 405 и Lys в позиции 409.

В другом воплощении гетеродимерного белка по изобретению ни указанный первый ни указанный второй полипептид не включает последовательность Cys-Pro-Ser-Cys в шарнирном участке.

В другом воплощении гетеродимерного белка по изобретению как указанный первый, так и указанный второй полипептид включает последовательность Cys-Pro-Ser-Cys в шарнирном участке.

В другом воплощении гетеродимерного белка по изобретению указанный первый и/или указанный второй полипептид включает мутацию, удаляющую акцепторный сайт для Asn-связанного гликозилирования.

Антигены-мишени.

Как пояснялось выше, в важном воплощении изобретения гетеродимерный белок представляет собой биспецифическое антитело, включающее два переменных участка, которые различаются по специфичности связывания, т.е. связывают различные эпитопы.

В принципе возможна любая комбинация специфичностей. Как указывалось выше, биспецифические антитела потенциально можно использовать для преодоления некоторых ограничений моноспецифических антител. Одним из возможных ограничений моноспецифических антител является утрата специфичности в отношении нужных клеток-мишеней из-за экспрессии антигена-мишени на других типах клеток, с которыми связывание антител нежелательно. Например, антиген-мишень, сверхэкспрессированный на опухолевых клетках, также может экспрессироваться на здоровых тканях, что может привести к нежелательному побочному действию после обработки антителами, направленными против такого антигена. Биспецифическое антитело с дополнительной специфичностью против белка, который экспрессируется исключительно на типе клетки-мишени, потенциально может улучшить специфическое связывание с опухолевыми клетками.

Так, в одном воплощении изобретения указанные первый и второй эпитопы локализованы на одной и той же клетке, например опухолевой клетке. Подходящие мишени на опухолевых клетках включают, но не ограничиваются указанным, следующее: erbB1 (EGFR), erbB2 (HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD19, CD20, CD4, CD38, CD138, CXCR5, c-Met, белок оболочки HERV, периостин, Bigh3, SPARC, BCR, CD79, CD37, EGFRvIII, L1-CAM, AXL, тканевый фактор (TF), CD74, EpCAM и MRP3. Возможные комбинации мишеней опухолевых клеток включают, но не ограничиваются указанным, erbB1 + erbB2, erbB2 + erbB3, erbB1 + erbB3, CD19 + CD20, CD38 + CD34, CD4 + CXCR5, CD38 + RANKL, CD38 + CXCR4, CD20 + CXCR4, CD20 + CCR7, CD20 + CXCR5, CD20 + RANKL, erbB2 + AXL, erbB1 + cMet, erbB2 + c-Met, erbB2 + EpCAM, c-Met + AXL, c-Met + TF, CD38 + CD20, CD38 + CD138.

В другом воплощении указанные первый и второй эпитопы могут быть локализованы на одном и том же антигене, при этом местоположение двух эпитопов на антигене-мишени таково, что связывание антитела с одним эпитопом не препятствует связыванию антитела с другим эпитопом. В другом таком воплощении указанные первый и второй гомодимерные белки представляют собой антитела, которые связываются с двумя различными эпитопами, локализованными на одном и том же антигене-мишени, но имеют различный тип действия для уничтожения клетки-мишени, например, опухолевой клетки. Например, в одном воплощении антиген-мишень представляет собой erbB2 (HER2), и биспецифическое антитело объединяет антигенсвязывающие сайты пертузумаба и трастузумаба. В другом воплощении антиген-мишень представляет собой erbB1 (EGFR), и биспецифическое антитело объединяет антигенсвязывающие сайты залутумаба и нимотумаба.

Биспецифические антитела также можно использовать как медиаторы для перенацеливания эффекторных механизмов на ткани, связанные с заболеванием, например, опухоли. Так, в другом воплощении указанный первый или указанный второй эпитоп локализован на опухолевой клетке, например в белке опухолевой клетки или углеводе опухолевой клетки, и другой эпитоп локализован на эффекторной клетке.

В одном воплощении эффекторная клетка представляет собой Т-клетку.

Возможные мишени на эффекторных клетках включают следующее: FcγRI (CD64), экспрессированный на моноцитах и макрофагах и активированных нейтрофилах; FcγRIII (CD16), экспрессированный на природном киллере и макрофагах; CD3, экспрессированный на циркулирующих Т-клетках; CD89, экспрессированный на PMN (полиморфонуклеарные нейтрофилы), эозинофилах, моноцитах и макрофагах; CD32a, экспрессированный на макрофагах, нейтрофилах, эозинофилах; FcεRI, экс-

прессированный на базофилах и тучных клетках. В одном воплощении эпитоп локализован на CD3, экспрессированном на Т-клетках.

В другом воплощении первое антитело имеет специфичность связывания в отношении патогенного микроорганизма, и второе антитело имеет специфичность связывания в отношении белка эффекторной клетки, такого как CD3, CD4, CD8, CD40, CD25, CD28, CD16, CD89, CD32, CD64, FcεRI или CD1.

Кроме того, биспецифические антитела можно использовать для нацеливания химиотерапевтического средства специфичнее на клетки, на которые средство должно действовать. Так, в одном воплощении один из гомодимерных белков представляет собой антитело, которое узнает небольшую молекулу или пептид или способно образовывать ковалентную связь с такой молекулой, например, согласно принципу, описанному в Rader et al., (2003), PNAS, 100: 5396. В другом воплощении способа по изобретению первое антитело имеет специфичность связывания в отношении (т.е. связывается с эпитопом на) опухолевой клетки или белка на поверхности клетки, такого как erbB1, erbB2, erbB3, erbB4, EGFR3vIII, CEA, MUC-1, CD19, CD20, CD4, CD38, EPCAM, c-Met, AXL, L1-CAM, тканевый фактор, CD74 или CXCR5, и второе антитело имеет специфичность связывания в отношении химиотерапевтического средства, такого как токсин (включая меченный радиоизотопом пептид), лекарственное средство или пролекарство.

Биспецифические антитела также можно использовать для нацеливания на опухоль везикулы, например, электронно-плотных везикул, или мини-клетки, содержащей токсин, лекарственное средство или пролекарство. См., например, MacDiarmid et al. (2009), Nature Biotech., 27: 643. Мини-клетки представляют собой ахромосомные клетки, которые являются продуктами аберрантного деления клеток, которые не содержат хромосомной ДНК. Так, в другом воплощении указанный первый или указанный второй эпитоп локализован на опухолевой клетке, например, в белке опухолевой клетки или углеводе опухолевой клетки, и другой эпитоп локализован на электронно-плотной везикуле или мини-клетке.

Кроме того, время полужизни антитела в кровяном русле может быть изменено путем включения в биспецифическое антитело специфичности связывания в отношении сывороточного белка. Например, время полужизни можно продлить путем включения в биспецифическое антитело специфичности связывания с сывороточным альбумином. Так, в другом воплощении способа по изобретению первое антитело имеет специфичность связывания в отношении опухолевой клетки или белка опухолевой клетки, такого как erbB1 (EGFR), erbB2 (HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD19, CD20, CD4, CD38, CD138, CXCR5, c-Met, белок оболочки HERV, периостин, Bigh3, SPARC, BCR, CD79, CD37, EGFRvIII, L1-CAM, AXL, тканевый фактор (TF), CD74, EPCAM или MRP3, CEA, и второе антитело имеет специфичность связывания в отношении белка крови, такого как сывороточный альбумин. Вторую специфичность связывания также можно использовать для нацеливания антитела на определенную ткань, такую как ткань центральной нервной системы или головного мозга (через гематоэнцефалический барьер). Так, в другом воплощении способа по изобретению первое антитело имеет специфичность связывания в отношении специфической мишени в головном мозгу, такой как амилоид-бета (например, для лечения болезни Альцгеймера), Her-2 (например, для лечения метастазов рака молочной железы в головном мозге), EGFR (например, для лечения первичного рака головного мозга), Nogo A (например, для лечения повреждения головного мозга), TRAIL (например, для лечения ВИЧ), альфа-синуклеин (например, для лечения болезни Паркинсона), Htt (например, для лечения болезни Гентингтона), прион (например, для лечения коровьего бешенства), белок вируса лихорадки Западного Нила, и второе антитело имеет специфичность связывания в отношении белка гематоэнцефалического барьера, такого как трансферриновый рецептор (TfR), инсулиновый рецептор, меланотрансферриновый рецептор (MTfR), лактоферриновый рецептор (LfR), рецептор 2 аполипротеина E (ApoER2), родственный LDL-рецептору белок 1 и 2 (LRP1 и LRP2), рецептор для конечных продуктов прогрессивного гликозилирования (RAGE), рецептор дифтерийного токсина = фактор роста, подобный гепаринсвязывающему эпидермальному фактору роста (DTR = HB-EGF), gp190 (Abbott et al., Neurobiology of Disease, 37 (2010), 13-25).

Специфичность связывания в отношении белка гематоэнцефалического барьера также можно использовать для другой мишени-молекулы не-антитела для определенной ткани, такой как ткань центральной нервной системы или головного мозга (через гематоэнцефалический барьер). Так, в другом воплощении один из гомодимерных белков представляет собой полноразмерное антитело со специфичностью связывания в отношении белка гематоэнцефалического барьера (такого как TfR, инсулиновый рецептор, MTfR, LfR, ApoER2, LRP1, LRP2, RAGE, DTR (= HB-EGF) или gp190), и другой гомодимерный белок представляет собой Fc-участок, соединенный по N- или C-концу с другим белком, таким как цитокин, растворимым рецептором или другим белком, таким как, например, VIP (вазоактивный интестинальный пептид), BDNF (нейротрофический фактор из головного мозга), FGF (фактор роста фибробластов), множественные FGF, EGF (эпидермальный фактор роста), PNA (пептиднуклеиновая кислота), NGF (фактор роста нервов), нейротрофин (NT)-3, NT 4/5, нейротрофический фактор глиального происхождения, ресничный нейротрофический фактор, нейртулин, нейрегулины, интерлейкины, трансформирующий фактор роста (TGF) альфа, TGF-бета, эритропоэтин, фактор роста гепатоцитов, тромбоцитарный фактор роста, артемин, персефин, нетрины, кардиотрофин-1, фактор стволовых клеток, мидкин, плейотрофин, костные морфогенные белки, сапозины, семафорины, лейкоцитарный ингибирующий фактор, альфа-L-идуронидаза, идуронат-2-сульфатаза, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатаза, арилсульфатаза B,

кислая альфа-глюкозидаза илисфингомиелиназа (Pardridge, *Biopharmaceutical drug targeting to the brain*, *Journal of Drug Targeting*, 2010, 1-11; Pardridge, *Re-engineering Biopharmaceuticals for delivery to brain with molecular Trojan horses*. *Bioconjugate Chemistry*, 2008, 19: 1327-1338).

Кроме того, вторую специфичность связывания можно использовать для нацеливания факторов свертывания крови в определенное нужное место действия. Например, биспецифическое антитело с первой специфичностью связывания для опухолевой клетки и второй специфичностью связывания для фактора свертывания крови может направить свертывание крови на опухоль и таким образом остановить рост опухоли. Так, в другом воплощении способа по изобретению первое антитело имеет специфичность связывания в отношении опухолевой клетки или белка опухолевой клетки, такого как *erbB1*, *erbB2*, *erbB3*, *erbB4*, *MUC-1*, *CD19*, *CD20*, *CD4* или *CXCR5*, и второе антитело имеет специфичность связывания в отношении белка, вовлеченного в свертывание крови, такого как тканевый фактор.

В частности, другие представляющие интерес комбинации специфичностей связывания включают *CD3 + HER2*, *CD3 + CD20*, *IL-12 + IL18*, *IL-1a + IL-1b*, *VEGF + EGFR*, *EpCAM + CD3*, *GD2 + CD3*, *GD3 + CD3*, *HER2 + CD64*, *EGFR + CD64*, *CD30 + CD16*, *NG2 + CD28*, *HER2 + HER3*, *CD20 + CD28*, *HER2 + CD16*, *Vc12 + CD3*, *CD19 + CD3*, *CEA + CD3*, *EGFR + CD3*, *IgE + CD3*, *EphA2 + CD3*, *CD33 + CD3*, *MCSP + CD3*, *PSMA + CD3*, *TF + CD3*, *CD19 + CD16*, *CD19 + CD16a*, *CD30 + CD16a*, *CEA + HSG*, *CD20 + HSG*, *MUC1 + HSG*, *CD20 + CD22*, *HLA-DR + CD79*, *PDGFR + VEGF*, *IL17a + IL23*, *CD32b + CD25*, *CD20 + CD38*, *HER2 + AXL*, *CD89 + HLA class II*, *CD38+CD138*, *TF + cMet*, *Her2 + EpCAM*, *HER2 + HER2*, *EGFR + EGFR*, *EGFR + c-Met*, *c-Met + несвязывающий фрагмент* и комбинации рецепторов в сочетании с G-белком.

В другом воплощении биспецифические антитела по изобретению можно использовать для выведения из кровообращения патогенов, патогенных антител или вредных соединений, таких как яды и токсины, путем нацеливания на эритроциты, по существу, так, как описано в Taylor et al., *J. Immunol.*, 158: 842-850 (1997), и в Taylor and Ferguson, *J. Hematother.*, 4: 357-362, 1995. Указанный первый эпитоп локализуется на белке эритроцита (красная клетка крови), в том числе, но без ограничения, рецепторе 1 эритроцитарного комплемента, и указанный второй эпитоп локализуется на соединении или организме, являющемся мишенью для очищения.

В другом воплощении второй Fab-фрагмент включает слитый белок, представляющий аутоантиген или сайт конъюгации для присоединения аутоантигена, такого как дпДНК. Нацеливание на патогены, аутоантитела или вредные соединения с помощью биспецифических антител по изобретению с последующим опосредованным эритроцитами очищением может иметь терапевтическую применимость при лечении различных заболеваний и синдромов.

Конъюгация.

В других воплощениях изобретения первый и/или второй гомодимерный белок соединяют с соединением, выбранным из группы, состоящей из токсина (включающего радионуклид), пролекарства или лекарственного средства. Такое соединение может убивать клетки-мишени эффективнее, например, при лечении рака. Полученный гетеродимерный белок представляет собой, таким образом, иммуноконъюгат. С другой стороны, соединение можно соединить с полученным гетеродимерным белком, т.е. после того, как произойдет обмен Fab-фрагментами.

Подходящие соединения для образования иммуноконъюгатов по настоящему изобретению включают таксол, цитохалазин В, грамицидин D, этидия бромид, эметин, митомицин, зтопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колцихин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрацинон, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин, антиметаболиты (такие как метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, флударабин, 5-флуороурацил, декарбазин, гидроксимочевину, аспарагиназу, гемцитабин, кладрибин), алкилирующие агенты (такие как мехлорэтамин, тиоэпу, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU), ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромманнит, стрептозотозин, дакарбазин (DTIC), прокарбазин, митомицин С, цисплатин и другие производные платины, такие как карбоплатин), антибиотики (такие как дактиномицин (прежде актиномицин), блеомицин, даунорубин (прежде дауномицин), доксорубин, идарубин, митрамицин, митомицин, митоксантрон, пликамицин, антрамицин (AMC)), дифтерийный токсин и родственные молекулы (такие как дифтерийная цепь А и ее активные фрагменты и гибридные молекулы), токсин рицин (такой как токсин цепи рицина А или дегликозилированного рицина А), холерный токсин, Shiga-подобный токсин (SLT-I, SLT-II, SLT-III), токсин LT, токсин С3, токсин Shiga, коклюшный токсин, столбнячный токсин, соевый ингибитор Bowman-Birk протеазы, экзотоксин *Pseudomonas*, алорин, сапорин, модекцин, желаний, цепь А абрина, цепь А модекцина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки *dianthin*, белки фитолакки американской (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *sapaonaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин и токсины эномицина. Другие подходящие конъюгированные молекулы включают рибонуклеазу (РНаза), ДНазу I, стафилококковый энтеротоксин А, антивирусный белок фитолакки американской, дифтерийный токсин, эндотоксин *Pseudomonas*, мейтанзиноиды, ауристатины (ММАЕ, ММАФ), аналоги калихеамицинов и дуокармицина (Ducry and Stump, *Bioconjugate Chem.*, 2010, 21: 5-13), долостатин-10, долостатин-15, иринотекан или его активные метаболиты SN38, пирролобензо-

диазепины (PBD).

В другом воплощении изобретения первый и/или второй гомодимерный белок соединяют с альфа-излучателем, включая, но не ограничиваясь указанным, торий-227, радий-223, висмут-212 и актиний-225.

В другом воплощении изобретения первый и/или второй гомодимерный белок соединяют с бета-излучающим радионуклидом, включая, но не ограничиваясь указанным, иодим-313, иттрий-90, фтор-18, рений-186, галлий-68, технеций-99, индий-111 и лютеций-177.

В другом воплощении соединение, которое конъюгируют, включает нуклеиновую кислоту или молекулу, ассоциированную с нуклеиновой кислотой. В одном таком аспекте настоящего изобретения конъюгированная нуклеиновая кислота представляет собой цитотоксичную рибонуклеазу, антисмысловую нуклеиновую кислоту, ингибирующую молекулу РНК (например, молекулу сиРНК), или иммуностимулирующую нуклеиновую кислоту (например, иммуностимулирующую молекулу ДНК, содержащую мотив CpG).

Можно использовать любой способ конъюгации, известный в технике, включая способы, описанные Hunter et al., *Nature*, 144, 945 (1962); David et al., *Biochemistry*, 13, 1014 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Meth.*, 40, 219 (1981); и Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30, 407 (1982). Конъюгаты можно получить химически, конъюгируя другую группу со стороны N-конца или C-конца белка (см., например, *Antibody Engineering Handbook*, edited by Osamu Kanemitsu, published by Chijin Shokan (1994)). Такие конъюгированные производные антител также можно получать путем конъюгации внутренних остатков или Сахаров в соответствующем случае. Вещества можно соединять с белком по настоящему изобретению или непосредственно или косвенно. Одним из примеров косвенного соединения второго вещества является соединение с помощью спейсерной группы. Технологии соединения для лекарственных средств-конъюгатов недавно суммированы Ducry and Stump (2010), *Bioconjugate Chem.*, 21:5.

Композиции и применения.

В другом основном аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей гетеродимерный белок по изобретению, описанный в данном описании, и фармацевтически приемлемый носитель.

Фармацевтические композиции можно получить согласно обычным методам, таким как методы, раскрытые в Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может включать, например, разбавители, наполнители, соли, буферы, детергенты (например, неионогенный детергент, такой как твин-20 или твин-80), стабилизаторы (например, сахара или безбелковые аминокислоты), консерванты, фиксаторы тканей, солюбилизаторы и/или другие материалы, подходящие для включения в фармацевтическую композицию.

Фармацевтически приемлемые носители включают любой и все подходящие растворители, дисперсные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, средства, регулирующие изотоничность, антиоксиданты и средства, замедляющие абсорбцию, и подобные средства, которые физиологически совместимы с соединением по настоящему изобретению. Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, включают воду, физиологический раствор, забуференный фосфатом физиологический раствор, этанол, декстрозу, полиолы (такие, как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль). Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления перед применением стерильных растворов или дисперсий для инъекции. Соответствующую текучесть можно сохранить, например, путем использования материалов, образующих покрытие, таких как лецитин, путем поддержания нужного размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также могут включать фармацевтически приемлемые антиоксиданты, например (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.; (2) жирорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксанизол, бутилированный гидрокситолуол, лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и (3) вещества, образующие комплексы с металлами, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТК), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п..

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также могут включать средства, регулирующие тоничность, такие как сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, глицерин, или хлорид натрия в композициях.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также могут содержать один или несколько адьювантов, соответствующих способу введения, такие как консерванты, смачивающие вещества, эмульгаторы, диспергирующие вещества или буферы, которые могут увеличивать период полувыведения или эффективность фармацевтической композиции. Соединение по настоящему изобретению можно ввести в препарат с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, такой как композиция с регулируемым высвобождением, в том числе импланты, трансдермальные пластыри и микрокапсулированные системы доставки. Такие носители могут включать желатин, глице-

рилмоноостеарат, глицерилдистеарат, биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как сополимер этилена и винилацетата, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полиуксусная кислота, одни или с воском, или другие материалы, хорошо известные в технике. Способы получения таких композиций вообще известны специалистам в данной области техники.

Стерильные растворы для инъекций можно получить, включая активное соединение в требуемом количестве в соответствующий растворитель с одним ингредиентом или комбинацией ингредиентов, например, перечисленных выше, по необходимости, с последующей стерилизацией микрофильтрацией.

Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях могут изменяться с тем, чтобы получить количество ингредиента, которое эффективно для достижения нужной терапевтической реакции у определенного пациента, композиции к способу введения, не являющегося токсичным для пациента. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от различных фармакокинетических факторов, включая активность используемой определенной композиции по настоящему изобретению, способ введения, время введения, путь экскреции используемого определенного соединения, длительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с используемыми определенными композициями, возраст, пол, массу, общее состояние здоровья и предшествующую историю болезни пациента, которого лечат, и факторы, хорошо известные в области медицины.

Фармацевтическую композицию можно вводить любым подходящим путем и способом. В одном воплощении фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят парентерально. Используемое в данном описании определение "вводимый парентерально" обозначает способы введения иные, чем энтеральное и местное введение, как правило, введение путем инъекции, и включает эпидермальную, внутривенную, внутримышечную, интраартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, интракардиальную, интрадермальную, интраперитонеальную, внутрисухожильную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, интраартикулярную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, интракраниальную, интраторакальную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию или инфузию.

В одном воплощении указанную фармацевтическую композицию вводят внутривенной или подкожной инъекцией или инфузией.

В главном аспекте изобретение относится к гетеродимерному белку по изобретению, такому как биспецифическое антитело по изобретению, для применения в качестве лекарственного средства. Гетеродимерный белок по изобретению можно использовать для ряда целей. В частности, как пояснялось выше, гетеродимерные белки по изобретению можно использовать для лечения различных форм рака, включая метастатический рак и рефракторный рак.

Таким образом, в одном аспекте изобретение относится к способу ингибирования роста и/или пролиферации и/или способу уничтожения опухолевой клетки, включающему введение индивидууму, нуждающемуся в этом, гетеродимерного белка по изобретению, описанного выше.

В другом воплощении гетеродимерные белки по изобретению используют для лечения иммунных и аутоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний, инфекционных болезней, сердечно-сосудистых заболеваний, болезней ЦНС и костно-мышечной системы.

Схемы лечения в вышеуказанных способах лечения и применения регулируются для обеспечения оптимальной желательной реакции (например, терапевтической реакции). Например, можно вводить один болус, можно вводить по времени несколько отдельных доз, или дозу можно пропорционально уменьшать или увеличивать, как требует терапевтическая ситуация.

Эффективные дозировки и схемы приема гетеродимерных белков зависят от заболевания или состояния, от которого лечат, и могут быть установлены специалистами в данной области техники. Например, неограничительный интервал терапевтически эффективного количества биспецифического антитела по настоящему изобретению составляет примерно 0,1-100 мг/кг, такой как примерно 0,1-50 мг/кг, например примерно 0,1-20 мг/кг, такой как 0,1-10 мг/кг, например примерно 0,5, примерно 0,3, примерно 1, примерно 3, примерно 5 или примерно 8 мг/кг.

Врач или ветеринар, как специалисты в своей области, могут легко определить и установить эффективное требуемое количество фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может использовать начальные дозы гетеродимерного белка в фармацевтической композиции на уровнях ниже требуемого для того, чтобы добиться нужного терапевтического эффекта, и постепенно повышать дозу до тех пор, пока не будет достигнут нужный эффект. Вообще, подходящая суточная доза композиции по настоящему изобретению будет представлять собой количество соединения, которое является наименьшей эффективной дозой для получения терапевтического эффекта. Введение может быть, например, парентеральным, таким как внутривенное, внутримышечное или подкожное.

Гетеродимерный белок по изобретению также можно вводить профилактически для того, чтобы уменьшить опасность развития заболевания, такого как рак, отсрочить начало возникновения события при развитии заболевания и/или уменьшить опасность рецидива, когда заболевание, такое как рак, находится в стадии ремиссии.

Гетеродимерные белки по настоящему изобретению, такие как биспецифические антитела, также

можно вводить при комбинированной терапии, т.е. в комбинации с другими терапевтическими средствами, релевантными для заболевания или состояния, от которого лечат. Соответственно, в одном воплощении лекарственное средство, содержащее гетеродимерный белок, является средством для комбинации с одним или несколькими другими терапевтическими средствами, такими как цитотоксические, химиотерапевтические или антиангиогенные средства. Такое комбинированное введение может быть одновременным, раздельным или последовательным. В другом воплощении настоящее изобретение относится к способу лечения или предупреждения заболевания, такого как рак, который включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества гетеродимерного белка, такого как биспецифическое антитело по настоящему изобретению, в сочетании с лучевой терапией и/или хирургическим лечением.

Гетеродимерные белки по настоящему изобретению, такие как биспецифические антитела, также можно использовать для диагностических целей.

Примеры

Пример 1. Экспрессирующие векторы для экспрессии человеческих IgG1-2F8 и IgG1-7D8.

Клонировать VH- и VL-кодирующие участки HuMab 2F8 (WO 02/100348) и HuMab 7D8 (WO 04/035607) в экспрессирующий вектор pConG1f (содержащий геномную последовательность константного участка аллотипа человеческого IgG1f (Lonza Biologies)) для получения тяжелой цепи человеческого IgG1 и pConKappa (содержащего константный участок человеческой легкой цепи каппа, Lonza Biologies) для получения легкой цепи каппа. В случае антител IgG4 VH-участки встраивают в вектор pTomG4 (содержащий геномную последовательность константного участка человеческого IgG4 в векторе pEE12.4 (Lonza Biologies)). С другой стороны, в последующих конструкциях используют векторы, содержащие полностью кодоноптоимизированные кодирующие участки тяжелой цепи (IgG1 или IgG4) в векторе pEE12.4 или человеческой легкой цепи каппа HuMab 2F8 или HuMab 7D8 в векторе pEE6.4 (Lonza Biologies).

Пример 2. Экспрессирующие векторы для экспрессии IgG1-2F8 с делетированным шарнирным участком и человеческого IgG1 и фрагментов CH2-CH3 IgG4, содержащих мутации.

Для введения мутаций в шарнирный и CH3-участки тяжелых цепей антитела используют набор для сайтнаправленного мутагенеза Quickchange (Stratagene, La Jolla, CA) согласно рекомендациям изготовителя. С другой стороны, полностью синтезированные конструкции или VH-участки клонируют в векторе, уже содержащем специфические кодирующие замены аминокислот.

Конструкции, кодирующие фрагменты CH2 и CH3, или конструируют методом ПЦР или синтезируют полностью кодоноптоимизированными. Такие конструкции имеют N-концевой сигнальный пептид и метку His 6 аминокислот и содержат аминокислоты 341-447 константного участка человеческого IgG1/4. Конструкции клонируют в pEE12.4.

Для того чтобы сконструировать молекулы IgG1 с делетированным шарнирным участком (Uni-G1), получают синтетическую конструкцию ДНК, кодирующую формат Uni-G1 для изотипов человеческого IgG1 с EGFR-специфичностью. В такой конструкции делегирован естественный шарнирный участок (определяемый шарнирным экзоном). Получают дополнительную мутацию Ser - Cys в позиции 158 в конструкции IgG1 для реутилизации связи Cys между HC- и LC-цепями в данном подтипе. Последовательность белка приводится ниже. Конструкцию встраивают в вектор pEE6.4 и называют pHG1-2F8.

QVQLV/ESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAIV

DDGSYKYYGDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMK
DYFDYWGGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHFTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVAPPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Пример 3. Экспрессирующие векторы для экспрессии IgG4-2F8 и IgG4-7D8 макаки-резуса.

Синтезируют векторы, содержащие кодирующие участки для тяжелой и легкой цепей IgG4 китайской макаки-резуса и VH- и VL-участки HuMab 2F8 и 7D8, полностью кодоноптоимизируют и встраивают в pEE12.4 (тяжелая цепь) и pEE6.4 (легкая цепь). Последовательность константного участка тяжелой цепи, которую используют (основанную на последовательности, описанной в Scinicariello et al., Immunology, 111: 66-74, 2004), следующая (выровнена с человеческой последовательностью):

Человеческий IgG4

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH

IgG4 макаки-резуса (Ch) -

STKGPSVFPLASCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH

Человеческий IgG4

TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYG

IgG4 макаки-резуса (Ch)

TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYVCNVVHEPSNTKVDKRVEFT--

Человеческий IgG4

PPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV

IgG4 макаки-резуса (Ch)

PPCPACPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV

Человеческий IgG4

QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV

IgG4 макаки-резуса (Ch)

QFNWYVDGAEVHNAQTKPRERQFNSTYRVVSVLTVTHQDWLNGKEYTCKV

Человеческий IgG4

SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY

IgG4 макаки-резуса (Ch)

SNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYILPPPQEELTKNQVSLTCLVTGFY

Человеческий IgG4

PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF

IgG4 макаки-резуса (Ch)

PSDIAVEWESNGQPENTYKTTTPVLDSDGSYLLYSKLTVNKSRWQPGNIF

Человеческий IgG4 SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

IgG4 макаки-резуса (Ch) TCSVMHEALHNHYTQKSLSVSPGK.

Используемая последовательность константного участка легкой цепи (CL) макаки-резуса -

AVAAPSVFIFPPSEDQVKSQTVSVVCLLNNFYPREASVKWKVDGVLKGTNSQES

VTEQDSKDNQYSLSSSTLTLSSSTDYQSHNVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC.

Пример 4. Получение антител временной экспрессией в клетках HEK-293F.

Антитела получают в бессывороточной среде в клетках HEK-293F (Invitrogen) путем котрансфекции релевантных экспрессирующих векторов для тяжелой и легкой цепей с использованием 293-фектина (Invitrogen) согласно инструкциям изготовителя.

Пример 5. Очистка антител IgG1 и IgG4.

Антитела IgG1 и IgG4 очищают аффинной хроматографией на белке А. Супернатанты клеточных культур фильтруют через самый последний фильтр 0,20 мкм с последующей загрузкой в 5-мл колонку с белком А (rProtein A FF, GE Healthcare, Uppsala, Швеция) и элюированием IgG 0,1 М лимонной кислотой-NaOH, pH 3. Элюат сразу же нейтрализуют 2 М трис-HCl, pH 9, и диализуют в течение ночи против 12,6 мМ раствора фосфата натрия, 140 мМ NaCl, pH 7,4 (B. Braun, Oss, The Netherlands). После диализа образцы стерильно фильтруют через 0,20-мкм фильтр. Концентрацию очищенного IgG1 определяют методом нефелометрии и по поглощению при 280 нм. Очищенные белки анализируют SDS-PAGE, IFF, масс-спектрометрией и гликоанализом.

Пример 6. Очистка фрагментов CH2-CH3.

Меченные His белки очищают аффинной хроматографией с иммобилизованными ионами металла (Ni²⁺) (Macherey-Nagel GmbH, Duren, Германия), обессоливают с использованием колонок PD-10 (GE Healthcare), уравновешенных PBS, и стерилизуют фильтрацией на конечных фильтрах 0,20 мкм. Концен-

трацию очищенных белков определяют по поглощению при 280 нм. Качество очищенных белков анализируют SDS-PAGE.

Пример 7. Получение биспецифических антител индуцированным GSH обменом Fab-фрагментами между антителами IgG4 человека и макаки-резуса.

Как указывалось выше, в WO 2008119353 (Genmab) описывается способ *in vitro* получения биспецифических антител, в котором биспецифическое антитело образуется путем обмена "Fab-фрагментами" или "полумолекулами" (обмена тяжелой цепи и присоединенной легкой цепи) между двумя моноспецифическими IgG4 или IgG4-подобными антителами после инкубации в условиях восстановления. Такая реакция обмена Fab-фрагментами является результатом реакции изомеризации дисульфидных связей, при которой дисульфидные связи между тяжелыми цепями в шарнирных участках моноспецифических антител восстанавливаются, и полученные свободные цистеины образуют новую дисульфидную связь между тяжелыми цепями с цистеиновыми остатками другой молекулы антитела с другой специфичностью. Полученный продукт представляет собой биспецифическое антитело с двумя Fab-фрагментами с различными последовательностями.

Для того чтобы проверить обмен Fab-фрагментами между антителами IgG4 человека и макаки-резуса, используют человеческий IgG4-2F8 (анти-EGFR), человеческий IgG4-7D8 (анти-CD20), IgG4-2F8 макаки-резуса и IgG4-7D8 макаки-резуса для составления всех возможных комбинаций двух антител. Для обмена Fab-фрагментами *in vitro* смеси антител, содержащие каждое антитело в конечной концентрации 4 мкг/мл в 0,5 мл PBS с 0,5 мл восстановленного глутатиона (GSH), инкубируют при 37°C в течение 24 ч. Для того чтобы остановить реакцию восстановления, к реакционной смеси добавляют 0,5 мл PBS/0,05% твин-20 (PBST).

Наличие биспецифических антител проверяют путем определения биспецифического связывания с использованием стандартного твердофазного иммуоферментного сэндвич-анализа (ELISA). Планшеты для ELISA (Greiner bio-one, Frickenhausen, Германия) сенсибилизируют в течение ночи раствором 2 мкг/мл (100 мкл/лунку) рекомбинантного внеклеточного домена EGFR в PBS при 4°C. Планшеты промывают один раз PBST. Серийные разведения образцов антител (0-1 мкг/мл в 3-кратных разведениях) в PBST/0,25 BSA (PBSTB) переносят в сенсиблизованные планшеты для ELISA (100 мкл/лунку) и инкубируют на планшетном шейкере (300 об/мин) в течение 60 мин при комнатной температуре (RT). Образцы отбрасывают, и планшеты промывают один раз PBS/0,05% твин-20 (PBST). Затем планшеты инкубируют на планшетном шейкере (300 об/мин) с 2 мкг/мл мышинных антиидиотипических моноклональных антител 2F2 SAB1.1 (направленных против 7D8; Genmab) в PBSTB (100 мкл/лунку) в течение 60 мин. Планшеты промывают один раз PBS/0,05% твин-20 (PBST). Затем планшеты инкубируют на планшетном шейкере (300 об/мин) с конъюгированным с HRP козым антимышиным IgG (15G; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Westgrove, PA, USA; 1:5,000) в PBSTB (100 мкл/лунку) в течение 60 мин при RT. Планшеты промывают один раз PBS/0,05% твин-20 (PBST). Добавляют ABTS (50 мг/мл; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Германия) (100 мкл/лунку) и инкубируют защищенными от света в течение 30 мин при RT. Реакцию останавливают 2% щавелевой кислотой (100 мкл/лунку; Riedel de Haen Seeize, Германия). После 10-мин выдержки при RT измеряют поглощение при 405 нм в планшет-ридере для ELISA.

На фиг. 1 показано, что комбинация IgG4 человека и макаки-резуса приводит к более биспецифическому связыванию (более высокая OD при 405 нм) по сравнению с каждой из комбинаций молекул IgG4 одинаковых видов. Такие результаты показывают, что происходит обмен Fab-фрагментами между IgG4 человека и IgG4 макаки-резуса. Кроме того, более биспецифическое связывание предполагает, что полумолекулы человеческого IgG4 показывают преимущественную димеризацию с полумолекулами IgG4 макаки-резуса (гетеродимеризация), приводящую к равновесию реакции обмена Fab-фрагментами, которое сдвигается в сторону биспецифического гетеродимера, вместо стехиометрического обмена и 50% гетеродимера и 50% гомодимеров.

Пример 8. Анализ последовательностей IgG4 человека и макаки-резуса.

Описана способность антитела участвовать в обмене Fab-фрагментами с вовлечением третьего константного домена (СН3), кроме так называемого пермиссивного (например, CPSC-содержащего) шарнирного участка, который требует только активированной восстановительной среды (Van der Neut Kolf-schoten, 2007, Science). В случае человеческих антител найдено, что обмен Fab-фрагментами является особенностью присущей IgG4, который имеет аргинин (R) в позиции 409 в домене СН3 и пермиссивный шарнирный участок (226-CPSC-229) (см. WO 2008145142 (Genmab)). В противоположность этому человеческий IgG1, который не участвует в обмене Fab-фрагментами, имеет лизин (K) в позиции 409 и устойчивый (т.е. непермиссивный) шарнирный участок (226-С33С-229) (EU-нумерация, см. также фиг. 16).

В попытке прояснить усиленный обмен Fab-фрагментами между IgG4 человека и макаки-резуса по сравнению с обменом Fab-фрагментами между молекулами IgG4 одного и того же вида анализируют кор шарнира и аминокислоты на поверхности раздела СН3-СН3 антител человека и макаки-резуса (см., например, Dall'Acqua et al. (1998), Biochemistry, 37: 9266, обзор по остаткам поверхности раздела СН3-СН3 у человека). На фиг. 2 показано, что последовательность кора шарнира IgG4 китайской макаки-резуса представляет собой 226-CPAC-229, и что СН3-домен содержит лизин (K) в позиции 409. Кроме того, вы-

равнивание последовательностей показывает, что IgG4 макаки-резуса характеризуется тремя заменами аминокислот на поверхности раздела СН3-СН3 по сравнению с человеческим IgG4: изолейцин (I) в позиции 350 у макаки-резуса против треонина (Т) у человека; треонин (Т) в позиции 370 у макаки-резуса против лизина (К) у человека и лейцин (L) в позиции 405 у макаки-резуса против фенилаланина (F) у человека.

Пример 9. Получение биспецифических антител с использованием индуцированного GSH обмена Fab-фрагментами между человеческим IgG4 и человеческим IgG1, содержащим последовательности СН3 IgG4 макаки-резуса.

Сообщается, в случае человеческих антител, что для создания возможности обмена Fab-фрагментами в молекулах IgG1 замена коровой шарнирной последовательности IgG1 (CPSC) последовательностью человеческого IgG4 эффекта не имеет, но что мутация СН3 до IgG4-подобной последовательности активирует обмен Fab-фрагментами (Van der Neut Kofschoten, 2007, Science).

На основании обмена Fab-фрагментами между IgG4 человека и макаки-резуса, который был описан в примере 7, анализируют, может ли последовательность СН3 IgG4 китайской макаки-резуса участвовать в обмене Fab-фрагментами с человеческим IgG1. Поэтому в человеческий IgG1-2F8 в дополнение к мутации P228S вводят тройную мутацию T350I-K370T-F405L (далее в данном описании упоминаемую как ITL), что приводит к шарнирной последовательности CPSC. Мутанты человеческого IgG1-2F8 комбинируют с человеческим IgG4-7D8 для индуцируемого GSH обмена Fab-фрагментами *in vitro*. Смеси антител, содержащие каждое антитело в конечной концентрации 5 мкг/мл в 0,5 мл PBS с 0,5 мМ GSH, инкубируют при 37°C в течение 0-3-6-24 ч. Для прекращения реакции к реакционной смеси добавляют твин 20 (PBST). Измерения биспецифического связывания в ELISA выполняют так, как описано в примере 7.

На фиг. 3 подтверждено, что введение только шарнира CPSC не вовлекает человеческий IgG1-2F8 в индуцируемый GSH обмен Fab-фрагментами, в комбинации с человеческим IgG4-7D8. Также введение в человеческий IgG1-2F8 аминокислот поверхности раздела СН3 (ITL), специфических для IgG4 макаки-резуса, при сохранении в то же время шарнира IgG1 дикого типа, не приводит к участию в обмене Fab-фрагментами в комбинации с человеческим IgG4-7D8 в указанных условиях. В противоположность этому, вариант последовательности остова человеческого IgG1-2F8, который содержит последовательность CPSC в шарнире и специфические для IgG4 макаки-резуса аминокислоты на поверхности раздела СН3 (ITL), показывает усиленное биспецифическое связывание после индуцированного GSH обмена Fab-фрагментами с человеческим IgG4-7D8 по сравнению с двумя человеческими антителами IgG4. Такие данные показывают, что CPSC-содержащий шарнир в комбинации с СН3-доменом, содержащим I, T и L в позиции 350, 370 и 405, соответственно, является достаточным условием для индуцируемого GSH обмена Fab-фрагментами, и что равновесие реакции обмена при комбинации с человеческим IgG4 сдвигается в сторону биспецифического продукта обмена.

Пример 10. Получение биспецифических антител *in vivo* путем обмена Fab-фрагментами между человеческим IgG4 и мутантами IgG1 или IgG4.

Для дальнейшей идентификации требуемых характеристик для участия в обмене Fab-фрагментами варианты человеческого IgG4 и IgG1 анализируют *in vivo*. Четырем самкам мышей SCID (Charles River, Maastricht, Нидерланды) на группу инъекцируют *i.v.* смеси антител, содержащие 400 мкг антитела (500 мкг 7D8 + 100 мкг 2F8) в общем объеме 300 мкл. Образцы крови берут из подкожной вены конечности через 3, 24, 48 и 72 ч после инъекции. Кровь собирают в пробирки, содержащие гепарин, и центрифугируют при 10000 g в течение 5 мин для отделения плазмы от клеток. Затем анализируют образование биспецифических антител, оценивая биспецифическую реактивность с CD20 и EGFR в ELISA с использованием серий разведенных образцов плазмы в PBSTB, как описано в примере 7. Биспецифические антитела в образцах плазмы определяют количественно подбором кривой методом нелинейной регрессии (GraphPad Software, San Diego, CA) с использованием смеси антител после обмена *in vitro* в качестве стандарта.

На фиг. 4 показано, что человеческий IgG4-2F8, в котором или шарнирная или СН3-последовательность превращена в соответствующую последовательность человеческого IgG1 (CPSC или R409K, соответственно), более не участвует ни в каком обмене Fab-фрагментами *in vivo*. Напротив, человеческий IgG1, в котором последовательности как шарнирного участка, так и СН3 поверхности раздела превращены в соответствующие последовательности человеческого IgG4 (CPSC и K409R, соответственно), способен принимать участие в обмене Fab-фрагментами *in vivo*. Такие данные показывают, что CPSC-содержащий шарнирный участок (S в позиции 228) в комбинации с СН3-доменом, содержащим аргинин (R) в позиции 409, является достаточным условием для создания возможности обмена Fab-фрагментами человеческим IgG1 *in vivo*.

Пример 11. Получение биспецифических антител индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами: обход/разрушение стабилизированного шарнира 2-Меркаптоэтиламин-НСl (2-МЕА) является умеренным восстановителем, который, как сообщается, селективно расщепляет дисульфидные связи в шарнирном участке антител, причем в то же время сохраняются дисульфидные связи между тяжелой и легкой цепями. Поэтому испытывают ряд концентраций 2-МЕА на его способность индуцировать получение биспецифических антител путем обмена Fab-фрагментами между двумя антителами, содержащими

шарнирные участки CPSC или CPPC. Смеси антител, содержащие каждое антитело в конечной концентрации 0,5 мг/мл, инкубируют с рядом концентраций 2-МЕА (0, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 7,0, 10,0, 15,0, 25,0 и 40,0 мМ) в общем объеме 100 мкл ТЕ при 37°C в течение 90 мин. Для того чтобы остановить реакцию восстановления, восстановитель 2-МЕА удаляют путем обессоливания образцов с использованием спинколонки (центрифужные фильтры Micron, 30k, Millipore) согласно рекомендациям изготовителя. Биспецифическое связывание измеряют ELISA, как описано в примере 7.

Индукцируемый 2-МЕА обмен проверяют для комбинации IgG4-2F8 × IgG4-7D8, содержащей шарнирные участки CPSC, и о которой известно, что она принимает участие в индуцируемом GSH обмене Fab-фрагментами, и для комбинации IgG1-2F8-ITL × IgG4-7D8-CPPC, не принимающей участие в индуцируемом GSH обмене Fab-фрагментами из-за стабилизированных шарнирных участков (описанных в примере 9, фиг. 3). Неожиданно обнаружилось, что 2-МЕА индуцирует отделение легких цепей от тяжелых цепей, что определено невозможным SDS-PAGE (данные не приводятся). Тем не менее, образуются функциональные биспецифические антитела, как показано на фиг. 5. Максимальный уровень биспецифического связывания после обмена Fab-фрагментами между человеческими IgG4-2F8 и IgG4-7D8 дикого типа достигается при концентрации 2-МЕА 2,0 мМ и сравним с уровнем, достигаемым с 0,5 мМ GSH, как описано в примере 9 (фиг. 3). Однако 2-МЕА способен индуцировать обмен Fab-фрагментами между человеческими антителами IgG1-2F8-ITL и IgG4-7D8-CPPC (со стабилизированными шарнирными участками) в зависимости от дозы. Хотя при низких концентрациях 2-МЕА биспецифические тела не образуются или образуются в малом количестве, вероятно, из-за присутствия последовательности CPPC в шарнирном участке обоих антител, образование биспецифических антител весьма эффективно при более высоких концентрациях 2-МЕА. Максимальное биспецифическое связывание достигается при 25 мМ 2-МЕА и превышает максимальное связывание после обмена Fab-фрагментами между двумя антителами IgG4 дикого типа. Такие максимальные уровни связывания сравнимы с уровнями, описанными в примере 9 (фиг. 3) для обработки GSH соответствующего антитела с шарниром CPSC (IgG1-2F8-CPSC-ITL). Так как IgG1-2F8-ITL, так и IgG4-7D8-CPPC - оба - содержат шарнир CPSC, такие данные указывают, что 2-МЕА может обходить требование шарнира CPSC для обмена Fab-фрагментами *in vitro*.

Пример 12. Масс-спектрометрия после получения биспецифических антител путем обмена Fab-фрагментами, индуцированного 2-МЕА.

Получение биспецифических антител индуцируемым 2-МЕА обменом Fab-фрагментами описана в примере 11, при этом биспецифическое связывание показано ELISA (фиг. 5). Для того чтобы подтвердить, что образовались биспецифические антитела, образцы анализируют масс-спектрометрией с ионизацией электронным распылением (ESI-МС) для определения молекулярных масс. Сначала образцы дегликозилируют путем инкубации 200 мкг антител в течение ночи при 37°C с 0,005 Е N-гликаназы (кат. № GKE-5006D; Prozyme) в 180 мкл PBS. Образцы обессоливают на Aquity UPLC™ (Waters, Milford, США) с колонкой 2,1×50 мм, BEH300 C18, 1,7 мкм, при 60°C и элюируют с градиентом смеси MQ воды (элюент А) и ацетонитрила для ЖХ-МС (элюент В) (Biosolve, Valkenswaard, Нидерланды), содержащей 0,05% муравьиной кислоты (Fluka Riedel-de Haën, Buchs, Германия). Масс-спектры времяпролетной масс-спектрометрии с ионизацией электронным распылением регистрируют он-лайн на масс-спектрометре micrOTOF™ (Bruker, Bremen, Германия), работающем по положительному типу. Перед анализом шкалу 500-4000 *m/z* калибруют с помощью смеси для настройки ES (Agilent Technologies, Santa Clara, США). Масс-спектры подвергают деконволюции с использованием максимальной энтропии, которую получают с помощью программы DataAnalysis™, v.3.4 (Bruker, Bremen, Германия). На основании молекулярной массы антител, используемых в данном эксперименте для обмена Fab-фрагментами, биспецифические антитела можно отличить от исходных антител (также описанных в примере 15, фиг. 9С для IgG1-2F8-ITL × IgG4-7D8-CPPC). Для пика биспецифических антител определяют площадь под кривой и делят на общую площадь под кривыми для вычисления процентного содержания биспецифического антитела в каждом образце. Фиг. 6А показывает три характерных масс-спектрометрических профиля реакции обмена Fab-фрагментами между IgG1-2F8-ITL и IgG4-7D8-CPPC с 0 мМ 2-МЕА (два пика, соответствующих исходным антителам), 7 мМ 2-МЕА (три пика, соответствующих исходным и биспецифическим антителам) и 40 мМ 2-МЕА (один пик, соответствующий биспецифическому антителу). Однородный пик биспецифического продукта показывает, что ошибочного спаривания легкой цепи не происходит, что могло бы привести к разделенным пикам. Количественные данные приводятся на фиг. 6В и показывают, что обмен Fab-фрагментами между IgG1-2F8-ITL и IgG4-7D8-CPPC приводит к почти 100% биспецифического антитела. В противоположность этому обмен Fab-фрагментами между антителами IgG4 дикого типа приводит к менее чем 50% биспецифического продукта. Такие данные подтверждают результаты по биспецифическому связыванию по ELISA, описанные в примере 11 (фиг. 5).

Пример 13. Устойчивость биспецифических антител, полученных обменом Fab-фрагментами, индуцированным 2-МЕА.

Проверяют устойчивость биспецифических антител, полученных индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами *in vitro*. Для этого 2 мкг биспецифического образца, образованного из IgG1-2F8-ITL и

IgG4-7D8-CPPC с помощью 7,0 mM 2-МЕА (как описано в примере 11, фиг. 5), используют в индуцированной GSH реакции обмена Fab-фрагментами в присутствии ряда концентраций (0, 2, 20, 100 мкг) нерелевантного IgG4 (IgG4-MG против ацетилхолинового рецептора), представляющих 0, 1-, 10-, 50-кратный избыток IgG4-MG по сравнению с 2 мкг биспецифического испытываемого образца. В данной реакции обмен Fab-фрагментами может привести к отсутствию биспецифического связывания EGFR/CD20. Условия для реакции восстановления с GSH такие же, как описанные в примере 7 (24 часа при 37°C в 0,5 мл PBS/0,5 мл GSH). Для прекращения реакции восстановления к реакционной смеси добавляют 0,5 мл PBSTB. Биспецифическое связывание измеряют в ELISA, как описано в примере 7. Биспецифическое связывание после реакции восстановления с GSH представлено относительно биспецифического связывания в исходном материале (контроль), которое принимают за 100%.

На фиг. 7А показано, что для полученного биспецифического образца IgG1-2F8-ITL × IgG4-7D8-CPPC биспецифическое связывание EGFR/CD20 после индуцированного GSH обмена Fab-фрагментами в присутствии нерелевантного IgG4 существенно не изменяется. Это показывает, что биспецифический продукт является устойчивым, т.е. не принимает участие в индуцируемом GSH обмене Fab-фрагментами. В качестве контроля, на фиг. 7В показано, что полученный образец IgG1-2F8 × IgG4-7D8 показывает уменьшенное биспецифическое связывание EGFR/CD20 после индуцированного GSH обмена Fab-фрагментами в присутствии нерелевантного IgG4, что показывает, что продукт неустойчив. Такие данные показывают, что гетеродимер, состоящий из тяжелой цепи человеческого IgG1, содержащей тройную мутацию T305I-K370T-F405L в CH3-домене, и тяжелой цепи человеческого IgG4, содержащей замену S228P, приводящую к стабилизированному шарниру (CPPC), является устойчивым.

Пример 14. Анализ фармакокинетики и устойчивости биспецифических антител, полученных обменом Fab-фрагментами, индуцированным 2-МЕА *in vivo*.

Биспецифические антитела, образованные *in vitro* индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8-ITL и IgG4-7D8-CPPC, инъецируют мышам SCID для анализа их устойчивости (обмен Fab-фрагментами *in vivo*) и фармакокинетических свойств (скорость плазменного клиренса) в сравнении с исходными антителами IgG1-2F8-ITL и IgG4-7D8-CPPC. Трех группам мышей (3 мыши на группу) инъецируют внутривенно в хвостовую вену 200 мкл очищенных антител: (1) 100 мкг биспецифических антител; (2) 100 мкг биспецифических антител + 1000 мкг нерелевантного IgG4 (натализумаб, анти- α 4-интегрин); (3) 50 мкг IgG1-2F8-ITL + 50 мкг IgG4-7D8-CPPC. Образцы крови (50-100 мкл) собирают пункцией в щеку через предварительно установленные промежутки времени после введения антител (10 мин, 3 ч, 1, 2, 7, 14, 21 день). Кровь собирают в содержащие гепарин пробирки и центрифугируют в течение 10 мин при 14000 g. Плазму до дальнейшего анализа хранят при -20°C.

Общую концентрацию IgG в плазме определяют ELISA. Условия анализа на последующих стадиях такие же, как для ELISA, описанного в примере 7. Конкретные соединения, используемые для определения общего IgG, следующие: покрытие с 2 мкг/мл мышинового античеловеческого IgG (клон МН16-1; CLB4 кат. № M1268); разведения образцов сыворотки (1:500 и 1:2500 для групп 1 и 3) и (1:2500 и 1:10000 для группы 2); конъюгат козий античеловеческий IgG, конъюгированный с HPR (клон 11H; Jackson; кат. № 109-035-098; 1:10000). Наличие биспецифических антител анализируют и определяют количественно ELISA по биспецифической реактивности с CD20 EGFR, как описано в примере 10.

На фиг. 8А показаны концентрации антител в плазме. Форма кривых плазменного клиренса идентична для всех групп, что указывает на то, что плазменный клиренс биспецифических антител в анализируемом временном интервале такой же, как для исходных антител IgG1-2F8-ITL и IgG4-7D8-CPPC. На фиг. 8В приведены концентрации в плазме биспецифических антител в зависимости от времени. Добавление к биспецифическим антителам 10-кратного избытка нерелевантного IgG4 не влияет на концентрации биспецифических антител, что показывает, что обмена Fab-фрагментами *in vivo* не происходит. После инъекции исходных антител (IgG1-2F8-ITL + IgG4-7D8-CPPC) биспецифические антитела в плазме не детектируются, что подтверждает, что указанные антитела не принимают участия в обмене Fab-фрагментами *in vivo*. Такие данные показывают, что продукт биспецифические антитела, полученные индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8-ITL и IgG4-7D8-CPPC, устойчивы *in vivo* (обмен Fab-фрагментами отсутствует) и показывают фармакокинетические свойства (скорость плазменного клиренса), сравнимые со свойствами исходных антител.

Пример 15. Чистота биспецифических антител, полученных индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между двумя антителами.

Партию биспецифических антител, полученных индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8-ITL и IgG4-7D8-CPPC, очищают на обессоливающей колонке с PD-10 (кат. № 17-0851-01; GE Healthcare). Затем чистоту биспецифического продукта проверяют электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE), высокоэффективной гель-хроматографией (HP-SEC) и масс-спектрометрией. Функциональность полученных биспецифических антител подтверждают по биспецифическому связыванию в ELISA (данные не приводятся).

SDS-PAGE выполняют в условиях восстановления и отсутствия восстановления на 4-12% NuPAGE гелях Bis-Tris (Invitrogen, Breda, Нидерланды) с использованием модифицированного метода Laemli

(Laemli, 1970, Nature, 227 (5259): 680-5), где образцы разгоняют при нейтральном pH. Гели для SDS-PAGE окрашивают кумасси и получают цифровое изображение с использованием GeneGenus (Synoptics, Cambridge, UK). На фиг. 9А показано, что образец антител после обмена Fab-фрагментами состоит из интактного IgG со следовым количеством полумолекул (H1L1), обнаруживаемых в невосстановленном геле (фиг. 9А-В).

Фракционирование HP-SEC выполняют с использованием устройства для разделения Waters-Alliance 2695 (Waters, Etten-Leur, Нидерланды), соединенного с колонкой TSK HP-SEC (G3000SW_{xl}; Toso Bioscience, via Omnibalo, Breda, Нидерланды), и детектора поглощения при двух λ , Waters 2487 (Waters). Образцы пропускают при 1 мл/мин. Результаты обрабатывают с использованием программы Empower, версия 2002, и выражают по пику в виде процента от общей высоты пика. На фиг. 9В показано, что образец >98% состоит из интактного IgG с частично образовавшимися агрегатами или без них.

Масс-спектрометрию выполняют так, как описано в примере 12. На фиг. 9С приведены профили масс-спектрометрии исходных материалов IgG1-2F8-ITL и IgG4-7D8-CPPC и биспецифического продукта, полученного индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8-ITL и IgG4-7D8-CPPC. Продукт в образце с обменными Fab-фрагментами имеет массу 145901 кД, что вполне соответствует биспецифическому продукту, образовавшемуся из IgG1-2F8-ITL ($146259,5/2 = 73130$) + IgG4-7D8-CPPC ($145542,0/2 = 72,771$). Кроме того, продукт биспецифического антитела демонстрирует однородный пик, что указывает на то, что не происходит ошибочного спаривания легких цепей, которое может привести к разделенным пикам. Такие данные показывают, что обмен Fab-фрагментами приводит к 100% биспецифическим антителам. Небольшие пики, обнаруживаемые помимо главного пика (КО) IgG4-7D8-CPPC и биспецифического образца, можно связать с присутствием одного (К1) или двух (К2) С-концевых лизинов.

Такие данные показывают, что ~100% образца биспецифических антител образуется путем индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами между IgG1-2F8-ITL и IgG4-7D8-CPPC.

Пример 16. Выявление роли замен Т350I, К370Т и F405L для участия в обмене Fab-фрагментами IgG1.

Для того чтобы далее идентифицировать детерминанты СН3-домена IgG1, которые требуются для участия IgG1 в обмене Fab-фрагментами, IgG1, содержащий тройную мутацию Т350I-К370Т-F405L (ITL), сравнивают с двойными мутантами Т350I-К370Т (IT), Т350I-F405L (IL) и К370Т-F405L (TL). Также испытывают мутанта с одной мутацией F405L (L). 2-МЕА используют в качестве восстановителя для индукции обмена Fab-фрагментами *in vitro* (50 мкг каждого антитела в 100 мкл PBS/25 мМ 2-МЕА в течение 90 мин при 37°C). В случае антитела с одной мутацией F405L используют неочищенные антитела из супернатанта временной трансфекции после обмена буфера на PBS с использованием центрифуг Amicon Ultra (30k, Millipore, кат. № UFC803096). Для того чтобы остановить реакцию восстановления, восстановитель 2-МЕА удаляют путем обессоливания образцов с использованием спин-колонок, как описано в примере 11. Образование биспецифических антител определяют по биспецифическому связыванию при измерении в ELISA, как описано в примере 7.

В IgG1-2F8 вводят тройную (ITL), двойные (IT, IL и TL) и одну мутацию (L). Полученные мутанты комбинируют с IgG4-7D8, содержащим шарнирный участок CPSC (дикий тип) или стабилизированный шарнирный участок (IgG4-7D8-CPPC), для обмена Fab-фрагментами с использованием 25 мМ 2-МЕА в течение 90 мин при 37°C. На фиг. 10А-В показывает, что мутанты IgG1-2F8-IL и -TL демонстрируют обмен Fab-фрагментами на таком же уровне, как тройной мутант ITL, безотносительно к IgG4-7D8 (шарнирный участок CPSC или CPPC), с которым их комбинируют. В противоположность этому биспецифическое связывание не обнаруживают для комбинации с мутантом IgG1-2F8-IT. На фиг. 10С показано, что мутант IgG1-2F8-F405L также демонстрирует обмен Fab-фрагментами безотносительно к IgG4-7D8 (шарнирный участок CPSC или CPPC), с которым его комбинируют. Такие данные показывают, что мутации F405L достаточно для участия человеческого IgG1 в обмене Fab-фрагментами в условиях, указанных выше.

Пример 17. Образование биспецифических антител индуцируемым 2-МЕА обменом Fab-фрагментами при различных температурах.

Способность 2-МЕА индуцировать образование биспецифических антител обменом Fab-фрагментами между двумя различными антителами проверяют при различных температурах. Реакции обмена Fab-фрагментами начинают путем инкубации 160 мкг человеческого IgG1-2F8-ITL со 160 мкг IgG4-7D8-CPPC в 320 мкл PBS/25 мМ 2-МЕА (конечная концентрация 0,5 мг/мл для каждого антитела) при 0°C или 20°C (RT) или 37°C. Из указанных реакционных смесей в различные моменты времени (0, 2,5, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180 и 240 мин) берут 20-мкл образцы. К каждому образцу добавляют 20 мкл PBS перед удалением восстановителя 2-МЕА путем обессоливания образцов с использованием 96-луночного планшета для обессоливания Zeba (7k, кат. № 89808, Thermo Fisher Scientific) согласно рекомендациям изготовителя. Общие концентрации антител определяют путем измерения поглощения при длине волны 280 нм с использованием спектрофотометра Nanodrop ND-1000 (Isogen Life Science, Maarsse, Нидерланды). Серийные разведения образцов антител (общая концентрация антител 0-20 мкг/мл в

25-кратных разведениях) используют в ELISA для измерения биспецифического связывания, как описано в примере 7.

На фиг. 11 показано, что наиболее эффективное образование биспецифических антител индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между человеческими IgG1-2F8-ITL и IgG4-7D8-CPPC обнаруживается при 37°C, причем максимальное биспецифическое связывание достигается через 45 мин. При комнатной температуре образуется меньше биспецифических антител, причем максимальное биспецифическое связывание достигается через 240 мин. При 0°C биспецифическое связывание на протяжении времени анализа не наблюдают.

Пример 18. Анализ различных восстановителей на их способность индуцировать образование биспецифических антител путем обмена Fab-фрагментами *in vitro*.

Выше показано, что 0,5 мМ GSH может индуцировать обмен Fab-фрагментами *in vitro* между человеческими IgG4 и IgG1-CPSC-ITL, но не между человеческими IgG4 и IgG1-ITL, содержащими устойчивый шарнир (фиг. 3). Кроме того, обнаружено, что 2-МЕА способен индуцировать обмен Fab-фрагментами между антителами со стабилизированными шарнирными участками, такими как IgG1-ITL × IgG4-CPPC (фиг. 5). Для того чтобы проверить, способны ли 2-МЕА или GSH в других концентрациях или другие восстановители индуцировать обмен Fab-фрагментами *in vitro* между двумя различными антителами, испытывают ряд концентраций 2-МЕА, GSH или DTT (дитиотреитол). Для этого комбинации 10 мкг человеческого IgG1-2F8-ITL и 10 мкг IgG4-7D8-CPPC в 20 мкл PBS (конечная концентрация 0,5 мг/мл для каждого антитела) инкубируют при 37°C с рядом концентраций различных восстановителей (0,0, 0,04, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 12,5, 25,0 и 50,0 мМ). Через 90 мин к каждому образцу добавляют 20 мкл PBS, и восстановитель удаляют путем обессоливания образцов с использованием спин-планшета для обессоливания, как описано в примере 17. Общие концентрации антител определяют так, как описано в примере 17. Серийные разведения образцов антител (общая концентрация антител 0-20 мкг/мл в 3-кратных разведениях) используют в ELISA для измерения биспецифического связывания, как описано в примере 7.

Фиг. 12 подтверждается, что 2-МЕА индуцирует максимальное биспецифическое связывание при концентрации 2-МЕА 25 мМ. Обнаружено, что DTT весьма эффективен при получении биспецифических антител с максимальным биспецифическим связыванием, достигаемым при 2,5 мМ DTT. GSH в концентрациях в интервале 0-5 мМ не способен индуцировать образование биспецифических антител путем обмена Fab-фрагментами между антителами IgG1-ITL и IgG4-CPPC, которые оба содержат стабилизированные шарнирные участки. Более высокие концентрации GSH (12,5-50 мМ) приводят к образованию агрегатов антител, как определено невосстанавливающим SDS-PAGE (данные не приводятся). Поэтому указанные образцы исключают из анализа. Такие данные показывают, что образование биспецифических антител путем обмена Fab-фрагментами между двумя различными антителами может быть индуцирована различными восстановителями.

Пример 19. Детерминанты в позиции 409 IgG1 для участия в индуцируемом 2-МЕА обмене Fab-фрагментами в комбинации с IgG1-ITL 2-МЕА может индуцировать обмен Fab-фрагментами между человеческими IgG1-ITL и IgG4-CPPC, как описано в примере 11 (фиг. 5). Остатки поверхности раздела СНЗ человеческих IgG1 и IgG4 различаются только в позиции 409: лизин (K) в IgG1 и аргинин (R) в IgG4 (описано в примере 8, фиг. 2). Поэтому проверяют, может ли замена лизина в позиции 409 на аргинин или любую другую аминокислоту (K409X) создать возможность для участия IgG1 в обмене Fab-фрагментами с IgG1-ITL. Комбинации 10 мкг человеческого IgG1-2F8-ITL и 10 мкг IgG1-7D8-K409X в 20 мкл PBS/25 мМ 2-МЕА (конечная концентрация 0,5 мг/мл для каждого антитела) инкубируют в течение 90 мин при 37°C. Используют неочищенные антитела из супернатантов временной трансфекции после обмена буфера на PBS с использованием центрифуг Amicon Ultra (30k, Millipore, кат. № UFC803096). После реакции обмена Fab-фрагментами к каждому образцу добавляют 20 мкл PBS, и восстановитель удаляют путем обессоливания образцов с использованием спин-планшета для обессоливания, как описано в примере 17. Серийные разведения образцов антител (общая концентрация антител 0-20 мкг/мл в 3-кратных разведениях) используют в ELISA для измерения биспецифического связывания, как описано в примере 7.

На фиг. 13А показаны результаты по биспецифическому связыванию после индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами между IgG1-2F8-ITL и IgG1-7D8-K409X. На фиг. 13В эффективность обмена оценивали как биспецифическое связывание образца относительно очищенной партии биспецифических антител, полученных при индуцированном 2-МЕА обмене Fab-фрагментами между IgG1-2F8-ITL и IgG4-7D8-CPPC, которое принимают за 100%. Такие данные также оценивают как (-) -отсутствие обмена Fab-фрагментами, (+/-) - слабый, (+) - средний или (++) - высокий обмен Fab-фрагментами, как представлено в табл. 1. Отсутствие обмена Fab-фрагментами (-) обнаруживают, когда в позиции 409 в IgG1-7D8 находится K (=дикий тип IgG1), L или M. Находят, что обмен Fab-фрагментами средний (+), когда в позиции 409 в IgG1-7D8 находится F, I, N или Y, и высокий (++) , когда в позиции 409 в IgG1-7D8 находится A, D, E, G, H, Q, R, S, T, V или W.

Таблица 1. Индуцированный 2-МЕА обмен Fab-фрагментами между IgG1-2F8-ITL и мутантами IgG1-7D8-K409X

IgG1-7D8-K409X	Обмен Fab-фрагментами x IgG1-2F8-ITL
A	++
D	++
E	++
F	+
G	++
H	++
I	+
K	-
L	-
M	-
N	+
Q	++
R	++
S	++
T	++
V	++
W	++
Y	+

Образование биспецифических антител после индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами *in vitro* между IgG1-2F8-ITL и мутантами IgG1-7D8-K409X определяют сэндвич-ELISA. (-) - отсутствие обмена, (+/-) -слабый, (+) - средний, (++) - высокий обмен Fab-фрагментами.

Пример 20. Дегликозилирование антител не влияет на образование биспецифических антител путем обмена Fab-фрагментами, индуцируемого 2-МЕА.

Образцы IgG4-7D8 и IgG4-7D8-CPPC дегликозилируют путем инкубации 200 мкг антител в течение ночи при 37°C с 0,005 Е N-гликаназы (кат. № GKE-5006D; Prozyme) в 180 мкл PBS. Такие образцы используют непосредственно в реакции обмена Fab-фрагментами. Обмен Fab-фрагментами выполняют путем инкубации 50 мкг каждого антитела в 100 мкл PBS/25 мМ 2-МЕА (конечная концентрация 0,5 мг/мл для каждого антитела) в течение 90 мин при 37°C. Восстановитель 2-МЕА удаляют путем обессоливания образцов с использованием спин-колонок, как описано в примере 11. Серийные разведения образцов антител (общая концентрация антител 0-20 мкг/мл в 3-кратных разведениях) используют в сэндвич-ELISA для измерения биспецифического связывания, как описано в примере 7.

Масс-спектрометрический анализ показывает, что реакция дегликозилирования приводит к получению антител, дегликозилированных на 100% (данные не приводятся). На фиг. 14 показано, что обмен Fab-фрагментами с участием дегликозилированных антител не отличается от обмена Fab-фрагментами с участием соответствующих гликозилированных антител (IgG4-2F8 x IgG4-7D8-дегликозилированный против IgG4-2F8 x IgG4-7D8, и IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC-дегликозилированный против IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC). Такие данные показывают, что дегликозилирование не оказывает действия на образование биспецифических антител путем обмена Fab-фрагментами, индуцированного 2-МЕА.

Примет 21. Количественное определение нековалентного взаимодействия СН3-СН3.

Сила взаимодействий на поверхности раздела СН3 должна быть такой, чтобы было возможным, чтобы обе тяжелые цепи исходных антител диссоциировали в реакции обмена Fab-фрагментами и чтобы они впоследствии ассоциировали в реакции гетеродимеризации. Поэтому анализируют корреляцию между способностью принимать участие в обмене Fab-фрагментами и силой нековалентного взаимодействия СН3-СН3 (константа диссоциации K_D). Индуцированный GSH обмен Fab-фрагментами выполняют так, как описано в примере 9 (0,5 мМ GSH при 37°C), для следующих комбинаций антител:

IgG1-2F8 x IgG1-7D8;
 IgG1-2F8-CPSC x IgG1-7D8-CPSC;
 IgG1-2F8-CPSC-T350I x IgG1-CPSC-7D8-T350I;
 IgG1-2F8-CPSC-K370T x IgG1-7D8-CPSC-K370T;
 IgG1-2F8-CPSC-ITL x IgG1-7D8-CPSC-ITL;
 IgG1-2F8-CPSC-K409R x IgG1-7D8-CPSC-K409R;
 IgG4-2F8 x IgG4-7D8;
 IgG4-2F8-R409K x IgG4-7D8-R409K;
 IgG4-2F8-R409A x IgG4-7D8-R409A;
 IgG4-2F8-R409L x IgG4-7D8-R409L;
 IgG4-2F8-R409M x IgG4-7D8-R409M;
 IgG4-2F8-R409T x IgG4-7D8-R409T;
 IgG4-2F8-R409W x IgG4-7D8-R409W;
 IgG4-2F8-F405A x IgG4-7D8-F405A;
 IgG4-2F8-F405L x IgG4-7D8-F405L;
 IgG4-2F8-Y349D x IgG4-7D8-Y349D;
 IgG4-2F8-L351K x IgG4-7D8-L351K;
 IgG4-2F8-E357T x IgG4-7D8-E357T;
 IgG4-2F8-S364D x IgG4-7D8-S364D;
 IgG4-2F8-K370Q x IgG4-7D8-K370Q;
 IgG4-2F8-K370E x IgG4-7D8-K370E.

Образование биспецифических антител измеряют путем определения биспецифического связывания в сэндвич-ELISA, как описано в примере 7. На фиг. 15A/B/C показаны результаты по биспецифическому связыванию после реакции обмена Fab-фрагментами.

Для того чтобы определить действие вышеуказанных мутаций СНЗ на силу взаимодействия СНЗ-СНЗ, получают фрагменты, состоящие только из доменов СН2-СНЗ. Отсутствие шарнирного участка в таких фрагментах предотвращает ковалентные дисульфидные связи между тяжелыми цепями. Фрагменты анализируют нативной масс-спектрометрией. У образцов меняют буфер на 100 мМ ацетата аммония, рН 7, с использованием спин-фильтровальных колонок с MWCO в 10 кД. Аликвоты (~1 мкл) серийно разведенных образцов (20 мкМ - 25 нМ; эквивалент мономера) загружают в боросиликатные капилляры с золотым гальваническим покрытием для анализа на масс-спектрометре LCT (Waters). Сигнал мономера M_s определяют как площадь под пиками мономеров как часть площади всех пиков в спектре (M_s/M_s+D_s), где D_s = сигнал димера). Концентрацию мономера при равновесии $[M]_{eq}$ определяют как $M_s[M]_0$, где $[M]_0$ представляет собой общую концентрацию белка в расчете на мономер. Концентрацию димера при равновесии $[D]_{eq}$ определяют как $([M]_0-[M]_{eq})/2$. Затем получают K_D из наклона графика $[D]_{eq}$ против $[M]_{eq}^2$. K_D нековалентных взаимодействий СНЗ-СНЗ приводится в табл. 2.

Анализируют корреляцию между способностью участвовать в обмене Fab-фрагментами и силой нековалентных взаимодействий СНЗ-СНЗ. На фиг. 15D/E приведены графики зависимости процента биспецифического связывания после обмена Fab-фрагментами от определенной K_D соответствующего фрагмента СН2-СНЗ (фиг. 15D для IgG1; фиг. 15E для IgG4). Такие данные предполагают, что в условиях испытания существует определенный интервал кажущихся величин K_D взаимодействия СНЗ-СНЗ, который обеспечивает эффективный обмен Fab-фрагментами.

Таблица 2. K_D нековалентных взаимодействий CH2-CH3

Конструкция CH2-CH3	K_D (M)	Различие, крат*
G1	$3,0 \times 10^{-9}$	1,0000
G1-T350I	$7,0 \times 10^{-9}$	0,4000
G1-K370T	$4,5 \times 10^{-8}$	0,0700
G1-ITL	$1,0 \times 10^{-6}$	0,0030
G1-K409R	$1,1 \times 10^{-7}$	0,0300
G4	$4,8 \times 10^{-8}$	1,0000
G4-R409K	$8,0 \times 10^{-9}$	6,0000
G4-R409A	$1,6 \times 10^{-7}$	0,3000
G4-R409L	$1,5 \times 10^{-8}$	3,2000
G4-R409M	$3,0 \times 10^{-9}$	16,0000
G4-R409T	$7,2 \times 10^{-7}$	0,0700
G4-R409W	$3,4 \times 10^{-5}$	0,0014
G4-F405A	$1,9 \times 10^{-5}$	0,0025
G4-F405L	$2,5 \times 10^{-5}$	0,0019
G4-L351K	$7,4 \times 10^{-7}$	0,0600
G4-E357T	$4,1 \times 10^{-5}$	0,0012
G4-S364D	$4,7 \times 10^{-8}$	1,0200
G4-K370Q	$1,1 \times 10^{-8}$	4,3000
G4-K370E	$2,0 \times 10^{-9}$	24,000

* По сравнению с соответствующими фрагментами CH2-CH3 IgG1 или IgG4 дикого типа.

Пример 22. Анализ различных восстановителей на их способность индуцировать образование биспецифических антител путем обмена Fab-фрагментами *in vitro* между IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R.

Обнаружено, что 2-МЕА и DTT индуцируют обмен Fab-фрагментами *in vitro* между человеческими IgG1-2F8 и IgG4-CPPC (фиг. 12). Проверяют, могут ли указанные восстановители также индуцировать обмен Fab-фрагментами *in vitro* между человеческими IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R. Испытывают ряд концентраций 2-МЕА, DTT, GSH и TCEP (трис(2-карбоксиил)фосфин). Обмен Fab-фрагментами выполняют так, как описано в примере 18. Ряд испытываемых концентраций различных восстановителей 2-МЕА, DTT или TCEP следующий: 0,0, 0,04, 0,1, 0,5, 1,0, 5,0, 25,0, 50,0 мМ.

Данные фиг. 17 подтверждают, что 2-МЕА индуцирует максимальный обмен Fab-фрагментами в концентрации 25 мМ, который постоянен при более высокой концентрации 50 мМ. Обнаружено, что DTT весьма эффективен при получении биспецифических антител с максимальным обменом Fab-фрагментами, достигаемым при 0,5 мМ DTT, который также постоянен при более высоких концентрациях DTT (1,0-5,0 мМ). Также обнаружено, что TCEP весьма эффективен при получении биспецифических антител с максимальным обменом Fab-фрагментами, достигаемым при 0,5 мМ. При концентрации 25,0 мМ обмен Fab-фрагментами с помощью TCEP нарушается. GSH в концентрациях в интервале 0,0-0,5 мМ не способен индуцировать образование биспецифических антител путем обмена Fab-фрагментами. Более высокие концентрации GSH (25,0-50,0 мМ) приводят к образованию агрегатов антител (данные не приводятся). Поэтому такие образцы исключают из анализа. Такие данные показывают, что образование биспецифических антител путем обмена Fab-фрагментами между двумя различными антителами может быть индуцирована различными восстановителями.

Пример 23. Получение биспецифических антител путем индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами между IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R.

Для того чтобы подтвердить образование биспецифических антител путем индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами между человеческими IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R, методом ESI-МС определяют молекулярные массы образцов продуктов реакций обмена Fab-фрагментами с рядом концентраций 2-МЕА. Ряд испытываемых концентраций следующий: 0,0, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 7,0, 10,0, 15,0, 25,0 и 40,0 мМ 2-МЕА. Обмен Fab-фрагментами (в PBS) и сэндвич-ELISA выполняют так, как описано в примере 11. ESI-МС выполняют так, как описано в примере 12.

На фиг. 18А показано, что 2-МЕА индуцирует обмен Fab-фрагментами между IgG1-2F8-F405L и IgG4-7D8-K409R в зависимости от дозы, причем эффективно приводит к образованию биспецифических антител с максимальным уровнем биспецифического связывания при концентрации 15,0 мМ 2-МЕА. Количественные данные ESI-МС представлены на фиг. 18В и показывают, что обмен Fab-фрагментами между IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R приводит к почти 100% биспецифических антител, что подтверждает результаты ELISA по биспецифическому связыванию.

Пример 24. Чистота биспецифических антител, полученных индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между человеческими IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R.

Партию биспецифических антител, полученных индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между человеческими IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R, очищают с использованием обессоливающей колонки с PD-10 (кат. № 17-0851-01; GE Healthcare). Затем чистоту биспецифического

продукта проверяют масс-спектрометрией, как описано в примере 12.

На фиг. 19 показано профили масс-спектрометрии исходных материалов IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R и биспецифического продукта, полученного индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R. Продукт в образце с обмененными Fab-фрагментами имеет массу 146160,7 кД, что соответствует биспецифическому продукту, образовавшемуся из IgG1-2F8-F405L ($146606,8/2 = 73303,3$) × IgG1-7D8-K409R ($146312,2/2 = 73156,1$). Кроме того, продукт биспецифического антитела показывает однородный пик, что показывает, что не происходит ошибочного спаривания легких цепей, которое может привести к разделенным пикам. Такие данные показывают, что обмен Fab-фрагментами приводит к приблизительно 100% биспецифическим антителам.

Пример 25. Анализ *in vivo* устойчивости и фармакокинетики биспецифических антител, полученных из IgG1-2F8-F405L и IgG4-7D8-K409R обменом Fab-фрагментами, индуцированным 2-МЕА.

Биспецифические антитела, полученные *in vitro* индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8-F405L и IgG4-7D8-K409R, инъецируют мышам SCID для анализа их устойчивости (обмен Fab-фрагментами *in vivo*) и фармакокинетических свойств, как описано в примере 14. Анализируют две группы мышей (3 мыши на группу): (1) 100 мкг биспецифических антител; (2) 100 мкг биспецифических антител + 1000 мкг нерелевантного IgG4 (IgG4-637, описан в WO 2007068255) С. Общую концентрацию IgG в образцах плазмы определяют ELISA так, как описано в примере 14, за исключением того, что в данном примере в качестве конъюгата для детекции используют козий античеловеческий IgG, конъюгированный с HPR (Jackson; кат. № 109-035-098; 1:10000). Наличие биспецифических антител в образцах плазмы анализируют и определяют количественно ELISA по биспецифической реактивности с CD20 и EGFR, как описано в примере 14.

На фиг. 20А приведены общие концентрации антител в плазме в зависимости от времени. Форма кривых плазменного клиренса идентична для обеих групп. На фиг. 20В приведены концентрации в плазме биспецифических антител в зависимости от времени. Добавление к биспецифическим антителам 10-кратного избытка нерелевантного IgG4 не влияет на концентрации биспецифических антител, что показывает, что обмена Fab-фрагментами *in vivo* не происходит. Такие данные показывают, что продукт биспецифического антитела, образованные *in vitro* индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8-F405L и IgG4-7D8-K409R, устойчивы *in vivo* (обмен Fab-фрагментами отсутствует).

Пример 26. Опосредуемое CDC уничтожение клеток биспецифическими антителами, полученными индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между человеческими IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R.

Антитело против CD20 IgG1-7D8 может эффективно убивать клетки, экспрессирующие CD20 за счет комплементзависимой цитотоксичности (CDC). В противоположность этому антитело против EGFR IgG1-2F8 не опосредует CDC на клетках-мишенях, экспрессирующих EGFR. Проверяют, способны ли еще мутант IgG1-7D8-K409R и биспецифическое антитело, полученное индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R, индуцировать CDC на клетках, экспрессирующих CD20. Клетки Дауди или Раджи (105) предварительно инкубируют с рядом концентраций антител в 80 мкл среды RPMI с добавлением 0,1% BSA в течение 15 мин на качалке при комнатной температуре. Добавляют 20 мкл сыворотки здорового человека (NHS) в качестве источника комплемента (конечная концентрация 20% NHS), и проводят инкубацию в течение 45 мин при 37°C. Добавляют 30 мкл охлажденной на льду среды RPMI с добавлением 0,1% BSA для прекращения реакции CDC. Погибшие и жизнеспособные клетки различают, добавляя 10 мкл 10 мкг/мл раствор иодида пропидия (PI) (конечная концентрация 1 мкг/мл) и анализом FACS.

На фиг. 21 показано, что на опосредуемое CDC уничтожение экспрессирующих CD20 клеток Дауди (фиг. 21А) и Раджи (фиг. 21В) введение мутации K409R не влияет. Как клетки Дауди, так и клетки Раджи не экспрессируют EGFR, что приводит к моновалентному связыванию биспецифических антител, образованных индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R. Тем не менее, биспецифическое антитело еще индуцирует опосредуемое CDC уничтожение клеток, экспрессирующих CD20. Такие данные показывают, что CDC-способность исходного антитела сохраняется в биспецифическом формате.

Пример 27. Опосредуемое ADCC уничтожение клеток биспецифическими антителами, полученными индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между человеческими IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R.

Антитело против EGFR IgG1-2F8 может эффективно убивать клетки, экспрессирующие EGFR, такие как A431, за счет антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Клетки A431 не экспрессируют CD20, и поэтому антитело против CD20 IgG1-7D8 не индуцирует ADCC на таких клетках. Проверяют, способны ли еще мутант IgG1-2F8-F405L и биспецифическое антитело, полученное индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R, индуцировать ADCC на клетках A431. Для выделения эффекторных клеток мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяют из цельной крови здорового донора с использованием пробирок Leucoser® (Greiner Bio-one, кат. № 227290) согласно рекомендациям изготовителя. Клетки-мишени метят, добавляя

100 мкКи ^{51}Cr к 5×10^6 клеток A431 в 1 мл среды RPMI с добавлением 0,1% BSA, и инкубируют в течение 60 мин на качалке при 37°C на водяной бане. Меченые клетки промывают и снова суспендируют в RPMI с добавлением 0,1% BSA. Меченые клетки-мишени (5×10^4) предварительно инкубируют в 100 мкл RPMI с добавлением 0,1% BSA в течение 15 мин с рядом концентраций антител (интервал конечной концентрации 0-10 мкг/мл в анализе на ADCC в 3-кратных разведениях) при комнатной температуре. Анализ на ADCC начинают, добавляя 50 мкл эффекторных клеток (5×10^6 клеток) при отношении Е:Т 100:1. После 4-часовой выдержки при 37°C определяют высвобожденный ^{51}Cr в сцинтилляционном счетчике как число импульсов в мин (чим) при трехкратном повторении эксперимента. Процент клеточной токсичности вычисляют с использованием следующей формулы:

$$\text{процент специфического лизиса} = (\text{экспериментальное чим} - \text{базисное чим}) / (\text{максимальное чим} - \text{базисное чим}) \times 100.$$

Максимальное высвобождение ^{51}Cr определяют, добавляя 50 мкл 5% тритона X-100 к 50 мкл клеток-мишеней (5×10^4 клеток), и базисное высвобождение определяют в отсутствие сенсibiliзирующего антитела и эффекторных клеток.

На фиг. 22 показано, что CD20-специфическое антитело IgG1-7D8 не индуцирует ADCC на CD20-отрицательных клетках A431. Как IgG1-2F8, так и мутант IgG1-2F8-F405L способны индуцировать ADCC на клетках A431, что показывает, что введение мутации F405L не влияет на эффекторную функцию ADCC. Также биспецифическое антитело, полученное из IgG1-2F8-F405L \times IgG1-7D8-K409R, индуцирует ADCC на клетках A431 в зависимости от дозы, что показывает, что эффекторная функция ADCC сохраняется в биспецифическом формате.

Пример 28. Детерминанты в позиции 405 IgG1 для участия в индуцируемом 2-МЕА обмене Fab-фрагментами в комбинации с IgG1-K409R.

В примере 16 показано, что мутации F405L достаточно для создания возможности для IgG1 участвовать в обмене Fab-фрагментами при комбинации с IgG1-7D8. Для дополнительного испытания детерминант в позиции 405 IgG1 для участия в индуцируемом 2-МЕА обмене Fab-фрагментами в комбинации с человеческим IgG1-K409R все возможные мутанты IgG1-2F8-F405X (за исключением С и Р) объединяют с IgG1-7D8-K409R. Процедуру выполняют с очищенными антителами, как описано в примере 19.

На фиг. 23 приведены результаты биспецифического связывания после индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами между IgG1-2F8-F405X и IgG1-7D8-K409R. Такие результаты также оценивают по шкале как (-) отсутствие обмена Fab-фрагментами, (+/-) слабый обмен, (+) средний или (++) высокий обмен Fab-фрагментами, что представлено в табл. 3. Отсутствие обмена Fab-фрагментами (-) обнаруживают, когда в позиции 405 в IgG1-2F8 находится F (- дикий тип IgG1). Находят, что обмен Fab-фрагментами слабый (+/-), когда в позиции 405 в IgG1-2F8 находится G или R. Находят, что обмен Fab-фрагментами высокий, когда в позиции 405 в IgG1-2F8 находится A, D, E, H, I, K, L, M, N, Q, S, T, V, W или Y. Такие данные показывают, что определенные мутации в позиции 405 IgG1 позволяют IgG1 участвовать в обмене Fab-фрагментами при комбинации с IgG1-K409R.

Таблица 3. Индуцированный 2-МЕА обмен Fab-фрагментами между мутантами IgG1-2F8-F405X и IgG1-7D8-K409R

IgG1-2F8-F405X	Обмен Fab-фрагментами x IgG1-7D8-K409R
A	++
D	++
E	++
F	-
G	+/-
H	++
I	++
K	++
L	++
M	++
N	++
Q	++
R	+/-
S	++
T	++
V	++
W	++
Y	++

Образование биспецифических антител после индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами in

in vitro между мутантами IgG1-2F8-F405X и IgG1-7D8-K409R определяют сэндвич-ELISA. (-) - отсутствие обмена, (+/-) - слабый, (+) - средний, (++) - высокий обмен Fab-фрагментами.

Пример 29. Детерминанты в позиции 407 IgG1 для участия в индуцируемом 2-МЕА обмене Fab-фрагментами в комбинации с IgG1-K409R.

В примере 28 показано, что некоторые единичные мутации в позиции F405 являются достаточными для обеспечения возможности участия человеческого IgG1 в обмене Fab-фрагментами в комбинации с IgG1-K409R. Для того чтобы проверить, могут ли другие детерминанты, находящиеся на границе раздела Fc:Fc в CH3-домене, также опосредовать механизм обмена Fab-фрагментами, выполняют мутагенез позиции 407 IgG1, и мутанты испытывают на участие в индуцируемом 2-МЕА обмене Fab-фрагментами в комбинации с человеческим IgG1-K409R. Все возможные мутанты IgG1-2F8-Y407X (за исключением C и P) комбинируют с IgG1-7D8-K409R. Процедуру выполняют с очищенными антителами, как описано в примере 19.

На фиг. 24 показаны результаты по биспецифическому связыванию после индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами между IgG1-2F8-Y407X и IgG1-7D8-K409R. Такие результаты также оценивают по шкале как (-) отсутствие обмена Fab-фрагментами, (+/-) слабый обмен, (+) средний или (++) высокий обмен Fab-фрагментами, что представлено в табл. 4. Отсутствие обмена Fab-фрагментами (-) обнаруживают, когда в позиции 407 в IgG1-2F8 находится Y (= дикий тип IgG1), E, K, Q или R. Находят, что обмен Fab-фрагментами слабый (+/-), когда в позиции 407 в IgG1-2F8 находится D, F, I, S или T, и средний (+), когда в позиции 407 в IgG1-2F8 находится A, H, N или V, и высокий, когда в позиции 407 в IgG1-2F8 находится G, L, M или W. Такие данные показывают, что определенные единичные мутации в позиции 407 IgG1 позволяют IgG1 участвовать в обмене Fab-фрагментами при комбинации с IgG1-K409R.

Таблица 4. Индуцированный 2-МЕА обмен Fab-фрагментами между мутантами IgG1-2F8-Y407X и IgG1-7D8-K409R

IgG1-2F8-Y407X	Обмен Fab-фрагментами x IgG1-7D8-K409R
A	+
D	+/-
E	-
F	+/-
G	++
H	+
I	+/-
K	-
L	++
M	++
N	+
Q	-
R	-
S	+/-
T	+/-
V	+
W	++
Y	-

Образование биспецифических антител после индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами между мутантами IgG1-2F8-Y407X и IgG1-7D8-K409R определяют сэндвич-ELISA. (-) - отсутствие обмена, (+/-) - слабый, (+) - средний, (++) - высокий обмен Fab-фрагментами.

Пример 30. Количественное определение нековалентного взаимодействия CH3-CH3 в гетеродимерах IgG1.

Как описано в примере 21, существует определенный интервал в силе взаимодействия CH3-CH3 гомодимеров, который допускает эффективный обмен Fab-фрагментами. Сила взаимодействий на поверхности раздела CH3 должна быть такой, чтобы было возможным, чтобы обе тяжелые цепи в исходных антителах (гомодимерах) диссоциировали в реакции обмена Fab-фрагментами, и чтобы они впоследствии ассоциировали в реакции гетеродимеризации. Для образования устойчивого гетеродимера сила гетеродимерного взаимодействия должна быть больше, чем сила гомодимерного взаимодействия, такой, чтобы благоприятствовать гетеродимеризации по сравнению с гомодимеризацией. Для того чтобы это подтвердить, измеряют силу взаимодействия CH3-CH3 в гетеродимерах и сравнивают с силой в гомодимерах. Измеряют K_D фрагментов CH2-CH3, образованных от гомодимеров IgG1-K409R, IgG1-F405L и IgG1-ITL, как описано в примере 21. Для определения K_D в гетеродимерах фрагменты домена CH2-CH3 (G1-F405L и G1-ITL) смешивают с фрагментом IgG1A-шарнира IgG1-7D8-K409R, которые содержат все домены антитела за исключением шарнира. Отсутствие шарнирных участков в обоих фрагментах предотвращает образование ковалентных дисульфидных связей между тяжелыми цепями. Фрагменты сме-

шивают и анализируют через 24 ч нативной масс-спектрометрией, как описано в примере 21. Величины K_D нековалентных взаимодействий CH2-CH3 в указанных фрагментах CH2-CH3 или смесях фрагментов CH2-CH3 с IgG1Δ-шарниром приводятся в табл. 5. Такие данные предполагают, что в условиях испытания сила гетеродимерного взаимодействия больше (K_D меньше), чем соответствующие гомодимерные взаимодействия.

Таблица 5

Конструкция CH2-CH3 / (IgG1Δ-шарнир)	Взаимодействие	K_D (М)
G1-F405L/G1-K409R	Гетеродимерное	$1,2 \times 10^{-8}$
G1-ITL/G1-K409R	Гетеродимерное	$1,7 \times 10^{-8}$
G1-K409R	Гомодимерное	$1,1 \times 10^{-7}$
G1-F405L	Гомодимерное	$8,5 \times 10^{-7}$
G1-ITL	Гомодимерное	$1,2 \times 10^{-6}$

Пример 31. Биохимический анализ биспецифических антител, полученных обменом Fab-фрагментами, индуцированным 2-МЕА.

Партию биспецифических антител, образованных индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8405L и IgG1-7D8-K409R, очищают на обессоливающей колонке PD-10 (кат. № 17-0851-01; GE Healthcare). Затем чистоту биспецифического продукта проверяют электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE), высокоэффективной гель-хроматографией (HP-SEC) и масс-спектрометрией, катионообменной ВЭЖХ (ВЭЖХ-СІЕХ), капиллярным изоэлектрофокусированием (сІЕF).

SDS-PAGE выполняют в условиях невосстановления (фиг. 25А) и восстановления (фиг. 25В), как описано в примере 15. На фиг. 25А показано, что образец антител после индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами состоит из интактного IgG со следами полумолекул (H1L1), которые обнаруживаются на невосстановительном геле.

HP-SEC выполняют так, как описано в примере 15. На фиг. 26(В) и фиг. 26(А) показаны профили HP-SEC исходных материалов IgG1-2F8405L и IgG1-7D8-K409R, соответственно. Профиль смеси (1:1) двух антител и биспецифического продукта, полученного индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8405L и IgG1-7D8-K409R, приведены на фиг. 26С и фиг. 26D, соответственно. Кроме того, на фиг. 26D показано, что образец на >99% состоит из интактного IgG практически в отсутствие образовавшихся агрегатов.

Масс-спектрометрию (ESI-МС) выполняют так, как описано в примере 12. На фиг. 27(В) и фиг. 27(А) приведены масс-спектрометрические профили исходных материалов IgG1-2F8405L и IgG1-7D8-K409R, соответственно. Профиль смеси (1:1) двух антител и биспецифического продукта, полученного индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8405L и IgG1-7D8-K409R, приведены на фиг. 27С и 27D соответственно. Продукт в образце от индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами имеет 146159,7 кД, что точно соответствует биспецифическому продукту, полученному из IgG1-2F8405L ($146289,0/2 = 73,145$) × IgG1-7D8-K409R ($146028,0/2 = 73,014$). Кроме того, полученные биспецифические антитела показывают однородный пик, что указывает, что не происходит ошибочного спаривания легких цепей, которое могло бы привести к разделенным пикам. Такие данные показывают, что индуцированный 2-МЕА обмен Fab-фрагментами приводит к биспецифическому IgG. Небольшие пики, показанные (*), являются результатом неполного дегликозилирования перед анализом. Такие данные показывают, что образец биспецифических антител был получен индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8405L и IgG1-7D8-K409R.

Капиллярное изоэлектрофокусирование (сІЕF) выполняют с использованием анализатора iCE280 (Convergent Biosciences). На фиг. 28А и 28В приведены профили сІЕF исходных материалов IgG1-2F8405L и IgG1-7D8-K409R соответственно. Профиль смеси (1:1) двух антител и биспецифического продукта, полученного индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8405L и IgG1-7D8-K409R, приведен на фиг. 28С и фиг. 28D, соответственно. Все образцы обессолены перед использованием. Конечные концентрации в смеси для анализа составляют 0,3 мг/мл IgG (0,35% метилцеллюлозы; 2% амфолитов-носителей 3-10; 6% амфолитов-носителей 8-10,5; 0,5% рІ-маркера 7,65 и 0,5% рІ-маркера 10,10). Фокусирование выполняют в течение 7 мин при 3000 В, и изображение поглощения во всем капилляре получают с помощью камеры прибора с зарядовой связью. После калибровки профилей пиков данные анализируют с помощью программы EZChrom. Маркеры рІ показаны (*). Такие данные показывают, что образец биспецифических антител был получен индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8405L и IgG1-7D8-K409R.

Другим методом изучения заряженных изоформ моноклональных антител является катионообменная высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ-СІЕХ). На фиг. 29А и 29В приведены профили ВЭЖХ-СІЕХ исходных материалов IgG1-2F8405L и IgG1-7D8-K409R соответственно. Профиль смеси (1:1) двух антител и биспецифического продукта, полученного индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8405L и IgG1-7D8-K409R, приведен на фиг. 29С и 29D, соответственно. Образцы для впрыскивания для ВЭЖХ разбавляют до 1 мг/мл в подвижной фазе А (10 мМ NaPO₄, рН 7,0). Различно заряженные молекулы IgG разделяют с использованием аналитической колонки 4 мм ×

250 мм, ProPac® WCX-10, скорость потока 1 мл/мин. Элюирование выполняют с градиентом от подвижной фазы А до подвижной фазы В (10 мМ NaPO₄, pH 7,0, 0,25 М NaCl), и детектирование происходит при 280 нм. Такие данные показывают, что образец биспецифических антител был получен индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8-405L и IgG1-7D8-K409R. Они также показывают, что катионный обмен является высокоэффективным инструментом для отделения остаточных гомодимеров от гетеродимера. Поэтому другим применением катионообменной хроматографии является тонкая очистка биспецифического гетеродимера, т.е. очистка от гомодимеров, оставшихся после обмена.

Пример 32. Рекombинантная экспрессия гетеродимеров путем одновременной коэкспрессии обоих гомодимеров.

Для того чтобы пояснить, что образование гетеродимера также происходит, когда два гомодимера совместно экспрессируют рекомбинантно, клетки НЕК-293F котрансфицируют четырьмя экспрессирующими векторами (см. пример 1), кодирующими тяжелую и легкую цепь IgG1-7D8-K409R и IgG1-2F8-F405, в соотношении 1:1:1:1. Антитела временно продуцируют в бессывороточных средах, как описано в примере 4. Затем IgG очищают хроматографией на белке А, как описано в примере 5. Очищенный IgG дегликозилируют и затем анализируют масс-спектрометрией с ионизацией электронным распылением, как описано в примере 12.

Теоретическая масса тяжелой и легкой цепи IgG1-7D8-K409R и IgG1-2F8-F405 приводится в табл. 6.

Таблица 6. Теоретическая масса тяжелой и легкой цепи IgG1-7D8-K409R и IgG1-2F8-F405

Гомодимер	Л-цепь (Д)	Н-цепь (Д)
IgG1-2F8-F405	23252,8	49894,6
IgG1-7D8-K409R	23438,1	49579,0

На основании указанных масс теоретически можно обнаружить молекулы IgG, указанные далее (табл. 7). Измеренные массы (фиг. 30) указаны в последней колонке.

Таблица 7. Теоретическое обнаружение тяжелой и легкой цепи IgG1-7D8-K409R и IgG1-2F8-F405

IgG1-2F8-F405		IgG1-7D8-K409R		Теоретическая масса (Д)	Измеренная масса (Д)
Н-цепь	Л-цепь	Н-цепь	Л-цепь		
2	2			146287	146284
		2	2	146026	146026
2			2	146657	146664
	2	2		145656	145660
2	1		1	146472	146477
	1	2	1	145841	145846
1	1	1	1	146157	146159
1	2	1		145971	145972
1		1	2	146342	146345

Два наиболее распространенных пика 146345 и 146159 Д представляют гетеродимеры с включенными одной (из IgG1-7D8-K409R) или обеими легкими цепями, соответственно. Гомодимеры обеих тяжелых цепей IgG1-7D8-K409R или IgG1-2F8-F405 детектируются, но только в незначительных количествах. Такие данные показывают, что гетеродимеризация также происходит, когда два гомодимера экспрессируют совместно.

Пример 33. Мониторинг кинетики индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами и количественное определение остаточных гомодимеров после обмена с использованием ВЭЖХ-СІЕХ.

Образование биспецифических антител индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами описывается в примере 11. В данном примере реакцию обмена отслеживают, осуществляя высокоэффективную катионообменную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ-СІЕХ; описана в примере 31) в различные моменты времени во время реакции обмена.

Гомодимеры IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R смешивают в молярном соотношении 1:1 каждого в концентрации 1 мг/мл. После добавления 25 мМ 2-МЕА образец помещают в автоматический пробоотборник ВЭЖХ, предварительно прогретый при 25°C. Фиг. 31А-31Н показывает полученные результаты ВЭЖХ-СІЕХ для восьми последовательных впрысков в различные временные интервалы, колеблющиеся от t = 0 до t = 450 мин, соответственно, после добавления 2-МЕА. Данные показывают, что биспецифический IgG образуется довольно быстро, и наибольшая часть гомодимера проходит обмен через 135 мин. Неоднородные гетеродимерные пики, появляющиеся через 45 мин, распадаются на более однородные пики через приблизительно 180 мин, что предполагает, что обмен происходит в различных фазах. Кроме того, фиг. 32А показывает, что методом СІЕХ обнаруживается приблизительно 3% остаточных гомодимеров (показано стрелками). Как видно, данный метод подходит для количественного определения содержания оставшихся гомодимеров (элюирование гомодимеров показано на фиг. 32В), когда реакция обмена почти завершена).

Пример 34. Получение биспецифических антител индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами при высоких концентрациях антител при различных концентрациях 2-МЕА, температурах и времени инкубации.

Индукцированный 2-МЕА обмен Fab-фрагментами выполняют при высоких концентрациях IgG. Исследуют влияние концентрации 2-МЕА, температуры инкубации и времени инкубации на итог обмена.

Процесс обмена выполняют с использованием комбинации IgG1-7D8-K409R × IgG1-2F8-F405L. Оба материала очищают аффинной хроматографией с использованием белка А. После достижения концентрации материала >20 мг/мл выполняют последующую стадию анионообменной хроматографии (по проточному типу) с использованием HiPrep Q FF 16/10 (GE Health Care, # 28-9365-43). Конечный очищенный материал обменивают с буфером PBS.

Биспецифический обмен исследуют при конечных концентрациях IgG в PBS 20 мг/мл (каждый гомодимер в конечной концентрации 10 мг/мл) и 10 мг/мл (каждый гомодимер в конечной концентрации 5 мг/мл). Отдельные смеси получают для обеих концентраций IgG, включая 2-МЕА в конечных концентрациях 10, 25, 50 и 100 мМ. Смеси делят на 100 аликвот в пробирках Эппендорфа и хранят при 15, 25 и 37°C. Отдельные пробирки используют для различного времени инкубации 90 мин, 5 ч и 24 ч при каждой температуре.

Также получают смесь без 2-МЕА для обеих концентраций IgG и хранят при 4°C как необработанный контроль. После соответствующего времени инкубации 90 мин и 5 ч образцы собирают для обессоливания для удаления 2-МЕА (образцы 90 мин сначала помещают на лед для прекращения реакции обмена). Образцы обессоливают с использованием 96-луночного планшета для обессоливания Zeba (7к, кат. № 89808, Thermo Fisher Scientific). Образцы 24 ч обессоливают отдельно после 24-часовой инкубации.

Серийные разведения образцов антител (общая концентрация антител 10-0,123 мкг/мл в 3-кратных разведениях для образцов 90 мин и 5 ч, 10 - 0,041 мкг/мл в 3-кратных разведениях для образцов 24 ч) используют в сэндвич-ELISA для измерения биспецифического связывания, как описано в примере 7. Для каждого планшета включают контроль - очищенную партию биспецифических антител, полученных при индуцированном 2-МЕА обмене Fab-фрагментами между IgG1-2F8-ITL и IgG4-7D8-CPPC (описанном в примере 15). На фиг. 24(A)-(F) приведены результаты по биспецифическому связыванию при измерении в отдельных планшетах для ELISA. Верхние значения OD405 (при определении в ELISA для концентраций 10 мкг/мл) используют для вычисления биспецифического связывания в сравнении с контролем, который произвольно принимают за 100%. Это приводит к проценту контролируемого обмена Fab-фрагментами (% cFAE) по сравнению с контролем для каждой концентрации 2-МЕА, как показано на фиг. 34(A)-(D).

Данные показывают, что максимальный уровень биспецифического связывания (89-109% относительно контроля) достигается при концентрации 2-МЕА 100 мМ для обеих концентраций IgG при всех условиях температура-время. При 50 мМ 2-МЕА максимальное связывание (86-107%) достигается при 25 и 37°C и также при 15°C после инкубации в течение 24 ч. В случае меньших концентраций 2-МЕА 25 мМ и 10 мМ обмен более эффективен при более высоких температурах и возрастает при продолжительном времени инкубации, причем к максимальному обмену приходят после инкубации при 37°C в течение 24 ч при 25 мМ 2-МЕА. Ни при одном из условий испытания при 10 мМ 2-МЕА не образуется 100% биспецифического продукта. Процесс обмена несколько ускоряется при концентрациях общего IgG 10 мг/мл по сравнению с 20 мг/мл.

Для того чтобы подтвердить, что биспецифические антитела образовались, и для более подробного исследования биспецифического продукта образцы анализируют с помощью катионообменного анализа (ВЭЖХ-СІЕХ). Анализ методом ВЭЖХ-СІЕХ выполняют так, как описано в примере 31, для образцов с концентрациями IgG 20 мкг/мл после инкубации в течение 5 и 24 ч и всех концентрациях 2-МЕА.

Хроматограммы СІЕХ на фиг. 35(A)-(D) показывают, что наибольший выход биспецифического продукта получают при 50 и 100 мМ 2-МЕА, что подтверждает результаты биспецифического ELISA. Однако при 50 и 100 мМ 2-МЕА все еще детектируются незначительные количества остаточных гомодимеров (2-3,5% каждого гомодимера для образцов, инкубированных при 25 и 37°C). Обмен при более высокой температуре, более длительном времени инкубации (24 ч) и повышении концентрации 2-МЕА приводит к появлению на профиле СІЕХ дополнительных пиков при 22-24 мин.

Минимальные количества дополнительных пиков получают, когда обмен завершают в пределах 5 ч. Для идентификации природы таких пиков выполняют анализ методом SDS-PAGE и HP-SEC. HP-SEC показывает, что количество агрегатов составляет менее 1% для всех условий, что предполагает, что дополнительные пики не представляют агрегаты. Однако невозстановительный SDS-PAGE показывает, что дополнительные пики могут представлять гетеродимер, лишенный одной или двух легких цепей. Также детектируются незначительные количества полумолекул.

Эксперимент показывает, что реакция обмена происходит при высоких концентрациях гомодимеров, что делает процесс привлекательным для коммерческого масштаба, и что выход биспецифических антител зависит от концентрации 2-МЕА, температуры и времени инкубации.

Пример 35. Детерминанты в позиции 368 IgG1 для участия в индуцируемом 2-МЕА обмене Fab-фрагментами в комбинации с IgG1-K409R.

Примеры 28 и 29 показывают, что определенные отдельные мутации в позиции F405 и Y407 являются достаточными для создания возможности для человеческого IgG1 участвовать в обмене Fab-фрагментами при комбинации с IgG1-K409R. Как поясняется в данном примере, другие детерминанты,

находящиеся на границе раздела Fc:Fc в домене CH3, также могут опосредовать механизм обмена Fab-фрагментами. Для такого эффекта выполняют мутагенез в позиции 368 IgG1, и испытывают мутанты на участие в индуцируемом 2-МЕА обмене Fab-фрагментами в комбинации с человеческим IgG1-K409R. Все возможные мутанты IgG1-2F8-L368X (за исключением С и Р) комбинируют с IgG1-7D8-K409R. Процедуру выполняют с очищенными антителами так, как описано в примере 19.

На фиг. 36 показаны результаты анализа биспецифического связывания после индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами между IgG1-2F8-L368X и IgG1-7D8-K409R. Такие результаты также оценивают по шкале как (-) отсутствие обмена Fab-фрагментами, (+/-) слабый обмен, (+) средний или (++) высокий обмен Fab-фрагментами, что представлено в табл. 8. Отсутствие обмена Fab-фрагментами (-) обнаруживают, когда в позиции 368 в IgG1-2F8 находится L (= дикий тип IgG1), F или M. Находят, что обмен Fab-фрагментами слабый (+/-), когда в позиции 368 в IgG1-2F8 находится Y. Находят, что обмен Fab-фрагментами средний (+), когда в позиции 368 в IgG1-2F8 находится K, и высокий (++) , когда в позиции 368 в IgG1-2F8 находится A, D, E, G, H, I, N, Q, R, S, T, V или W. Такие данные показывают, что определенные единичные мутации в позиции 368 IgG1 допускают участие в индуцированном 2-МЕА обмене Fab-фрагментами при комбинации с IgG1-K409R.

Таблица 8. Индуцированный 2-МЕА обмен Fab-фрагментами между мутантами IgG1-2F8-L368X и IgG1-7D8-K409R

IgG1-2F8-L368X	Обмен Fab-фрагментами x IgG1-7D8-K409R
A	++
D	++
E	++
F	-
G	++
H	++
I	++
K	+
L	-
M	-
N	++
Q	++
R	++
S	++
T	++
V	++
W	++

Образование биспецифических антител после индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами *in vitro* между мутантами IgG1-2F8-L368X и IgG1-7D8-K409R определяют сэндвич-ELISA. (-) - отсутствие обмена, (+/-) - слабый, (+) - средний или (++) - высокий обмен Fab-фрагментами.

Пример 36. Детерминанты в позиции 370 IgG1 для участия в индуцируемом 2-МЕА обмене Fab-фрагментами в комбинации с IgG1-K409R.

Примеры 28, 29 и 31 показывают, что определенные отдельные мутации в позиции F405, Y407 или L368 являются достаточными для создания возможности для человеческого IgG1 участвовать в обмене Fab-фрагментами при комбинации с IgG1-K409R. Как поясняется в данном примере, другие детерминанты, находящиеся на границе раздела Fc:Fc в домене CH3, также могут опосредовать механизм обмена Fab-фрагментами. Для такого эффекта выполняют мутагенез в позиции 370 IgG1, и испытывают мутанты на участие в индуцируемом 2-МЕА обмене Fab-фрагментами в комбинации с человеческим IgG1-K409R. Все возможные мутанты IgG1-2F8-K370X (за исключением С и Р) комбинируют с IgG1-7D8-K409R. Процедуру выполняют с очищенными антителами так, как описано в примере 19.

На фиг. 37 показаны результаты по биспецифическому связыванию после индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами между IgG1-2F8-K370X и IgG1-7D8-K409R. Такие результаты также оценивают по шкале как (-) отсутствие обмена Fab-фрагментами, (+/-) слабый обмен, (+) средний или (++) высокий обмен Fab-фрагментами, что представлено в табл. 9. Отсутствие обмена Fab-фрагментами (-) обнаруживают, когда в позиции 370 в IgG1-2F8 находится K (= дикий тип IgG1), A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, R, S, T, V или Y. Только замена K370W приводит к среднему обмену Fab-фрагментами (+). Такие данные показывают, что только одна мутация в позиции 370 (K370W) допускают участие IgG1 в индуцированном 2-МЕА обмене Fab-фрагментами при комбинации с IgG1-K409R.

Таблица 9. Индуцированный 2-МЕА обмен Fab-фрагментами между мутантами IgG1-2F8-K370X и IgG1-7D8-K409R

IgG1-2F8-K370X	Обмен Fab-фрагментами x IgG1-7D8-K409R
A	-
D	-
E	-
F	-
G	-
H	-
I	-
K	-
L	-
M	-
N	-
Q	-
R	-
S	-
T	-
V	-
W	+
Y	-

Образование биспецифических антител после индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами *in vitro* между мутантами IgG1-2F8-K370X и IgG1-7D8-K409R определяют сэндвич-ELISA. (-) - отсутствие обмена, (+/-) - слабый, (+) - средний или (++) - высокий обмен Fab-фрагментами.

Пример 37. Детерминанты в позиции 399 IgG1 для участия в индуцируемом 2-МЕА обмене Fab-фрагментами в комбинации с IgG1-K409R.

Примеры 28, 29, 35 и 36 показывают, что определенные отдельные мутации в позиции F405J, Y407, L368 или K370 являются достаточными для создания возможности для человеческого IgG1 участвовать в обмене Fab-фрагментами при комбинации с IgG1-K409R. Как показано в данном примере, другие детерминанты, находящиеся на границе раздела Fc:Fc в домене CH3, также могут опосредовать механизм обмена Fab-фрагментами. Для такого эффекта выполняют мутагенез в позиции 399 IgG1, и испытывают мутанты на участие в индуцируемом 2-МЕА обмене Fab-фрагментами в комбинации с человеческим IgG1-K409R. Все возможные мутанты IgG1-2F8-D399X (за исключением C и P) комбинируют с IgG1-7D8-K409R. Процедуру выполняют с очищенными антителами так, как описано в примере 19.

На фиг. 28 показаны результаты по биспецифическому связыванию после индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами между IgG1-2F8-D399X и IgG1-7D8-K409R. Такие результаты также оценивают по шкале как (-) отсутствие обмена Fab-фрагментами, (+/-) слабый обмен, (+) средний или (++) высокий обмен Fab-фрагментами, что представлено в табл. 10. Отсутствие обмена Fab-фрагментами (-) обнаруживают, когда в позиции 399 в IgG1-2F8 находится D (= дикий тип IgG1), E и Q. Находят, что обмен Fab-фрагментами слабый (+/-), когда в позиции 399 в IgG1-2F8 находится V, средний (+), когда в позиции 399 в IgG1-2F8 находится G, I, L, M, N, S, T или W. Находят, что обмен Fab-фрагментами высокий (++) , когда в позиции 399 в IgG1-2F8 находится A, F, H, K, R или Y. Такие данные показывают, что определенные мутации в позиции 399 IgG1 допускают участие в индуцированном 2-МЕА обмене Fab-фрагментами при комбинации с IgG1-K409R.

Таблица 10. Индуцированный 2-МЕА обмен Fab-фрагментами между мутантами IgG1-2F8-D399X и IgG1-7D8-K409R

IgG1-2F8-D399X	Обмен Fab-фрагментами x IgG1-7D8-K409R
A	++
D	-
E	-
F	++
G	+
H	++
I	+
K	++
L	+
M	+
N	+
Q	-
R	++
S	+
T	+
V	+/-
W	+
Y	++

Образование биспецифических антител после индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами *in vitro* между мутантами IgG1-2F8-D399X и IgG1-7D8-K409R определяют сэндвич-ELISA. (-) - отсутствие обмена, (+/-) - слабый, (+) - средний или (++) - высокий обмен Fab-фрагментами.

Пример 38. Определение интервала условий, в котором индуцируемый 2-МЕА обмен Fab-фрагментами происходит субоптимально для того, чтобы видеть различия между высокоэффективными мутантами IgG1.

Процесс индуцируемого 2-МЕА обмена Fab-фрагментами происходит эффективно при 37°C, когда используют 25 мМ 2-МЕА. В таких условиях большинство пермиссивных мутантов IgG1 (IgG1 с некоторыми единичными мутациями в позициях 368, 370, 399, 405 и 407 и/или 409, как описано в примерах 19, 28, 29 и 35-37) показывает высокие уровни индуцируемого 2-МЕА обмена Fab-фрагментами (80-100%). Для того чтобы идентифицировать условия эксперимента, которые дадут возможность видеть различия между мутантами IgG1 с наивысшей эффективностью, исследуют индуцируемый 2-МЕА обмен Fab-фрагментами для четырех различных комбинаций мутантов (IgG1-2F8-F405S × IgG1-7D8-K409A, IgG1-2F8-D399R × IgG1-7D8-K409G, IgG1-2F8-L368R × IgG1-7D8-K409H и IgG1-2F8-F405L × IgG1-7D8-K409R) со временем при 15 и 20°C, соответственно. Кроме изменений в температуре, периоде времени и разведения антител (20, 2, 0,2 и 0,02 мкг/мл), процедуру выполняют так, как описано в примере 19.

При 20°C индуцируемый 2-МЕА обмен Fab-фрагментами четырех комбинаций мутантов происходит с различными скоростями по сравнению с максимальным обменом (положительный контроль). После инкубации в течение 105 мин IgG1-2F8-L368R × IgG1-7D8-K409H достигает максимального уровня обмена, в то время как IgG1-2F8-F405S × IgG1-7D8-K409A, IgG1-2F8-D399R × IgG1-7D8-K409G и IgG1-2F8-F405L × IgG1-7D8-K409R достигают максимума в 90%, 85% и 85% соответственно через 200 мин.

Инкубация различных комбинаций мутантов IgG1 при 15°C показывает наиболее заметные различия в скоростях обмена (как показано на фиг. 39). После инкубации в течение 60 и 105 мин при индуцируемом 2-МЕА обмене Fab-фрагментами различия между четырьмя комбинациями мутантов являются наибольшими. Обмен Fab-фрагментами после инкубации в течение 200 мин показывает эффективность 100% (IgG1-2F8-L368R × IgG1-7D8-K409H), 85% (IgG1-2F8-F405L × IgG1-7D8-K409R и IgG1-2F8-D399R × IgG1-7D8-K409G) или 65% (IgG1-2F8-F405S × IgG1-7D8-K409A) по сравнению с положительным контролем.

Пример 39. Анализ эффективности индуцируемого 2-МЕА обмена Fab-фрагментами мутантов в субоптимальных условиях.

Процесс индуцируемого 2-МЕА обмена Fab-фрагментами происходит эффективно при 37°C, когда используют 25 мМ 2-МЕА. В таких условиях большинство пермиссивных мутантов IgG1 (IgG1 с некоторыми единичными мутациями в позициях 368, 370, 399, 405 и 407 и/или 409, как описано в примерах 19, 28, 29 и 35-37) показывает высокие уровни индуцируемого 2-МЕА обмена Fab-фрагментами (80-100%). В примере 38 описывается, что различия в эффективности индуцируемого 2-МЕА обмена Fab-фрагментами наиболее заметны после инкубации в так называемых субоптимальных условиях, а именно, при 15°C в течение 60 и 105 мин. В целом отбирают 24 мутанта IgG1-2F8 по L368, D399, F405 и Y407 (см. табл. 11), которые показывают >90% индуцируемый 2-МЕА обмен Fab-фрагментами с IgG1-7D8-K409R (примеры 28, 29 и 35-37), и подвергают анализу на обмен Fab-фрагментами с IgG1-7D8-K409A, G, H или R (на основании результатов, приведенных в примере 19). Для распределения по категориям таких комбинаций мутантов по их эффективности при образовании биспецифических антител выполняют индуцируемый 2-МЕА обмен Fab-фрагментами при 15°C в течение 90 мин (субоптимальные условия). Два мутанта IgG1-2F8 (Y407Q и D399Q), которые показывают слабый индуцированный 2-МЕА обмен Fab-фрагментами после инкубации с IgG1-7D8-K409R (примеры 29 и 37), берут вместе с дополнительными отрицательными контролями и используют для исследования того, ведет ли инкубация с другой аминокислотой в позиции K409 (G, H или W) к другому результату. Кроме изменения в температуре и изменений в разведении антител (20, 2, 0,2 и 0,02 мкг/мл) процедуру выполняют так, как описано в примере 19.

Инкубация всех различных комбинаций мутантов IgG1 (как становится ясно из табл. 11) при 15°C в течение 90 мин дает интервал различной эффективности индуцированного 2-МЕА обмена Fab-фрагментами. Результаты по биспецифическому связыванию при концентрации антител 20 мкг/мл приводятся в табл. 11. Результаты подразделяют на четыре класса: отсутствие (-), слабая (+/-), промежуточная (+) и сильная (++) эффективность биспецифического связывания, как определено в описании к табл. 11. Из таких результатов становится ясно, что в субоптимальных условиях некоторые комбинации мутаций аминокислот в молекулах IgG1 будут благоприятны для обмена Fab-фрагментами, индуцируемого 2-МЕА.

Таблица 11. Биспецифическое связывание (% относительно положительного контроля) между пермисивными мутантами IgG1 (20 мкг/мл) при 15°C в течение 90 мин

Обмен Fab-фрагментами	IgG1-7D8-K409A	IgG1-7D8-K409G	IgG1-7D8-K409R	IgG1-7D8-K409H
IgG1-2F8-L368A	33	33	25	37
IgG1-2F8-L368D	49	50	41	54
IgG1-2F8-L368E	32	38	37	42
IgG1-2F8-L368G	46	53	44	53
IgG1-2F8-L368H	26	25	21	29
IgG1-2F8-L368N	47	52	43	54
IgG1-2F8-L368R	55	64	52	59
IgG1-2F8-L368S	39	45	37	53
IgG1-2F8-L368T	42	51	39	56
IgG1-2F8-L368V	42	49	33	51
IgG1-2F8-L368W	56	56	41	60
IgG1-2F8-D399F	13	15	14	15
IgG1-2F8-D399H	12	14	10	19
IgG1-2F8-D399K	40	43	34	46
IgG1-2F8-D399R	47	45	38	52
IgG1-2F8-D399Q	0	0	0	0
IgG1-2F8-F405I	32	49	39	60
IgG1-2F8-F405K	29	48	47	40
IgG1-2F8-F405L	31	44	39	46
IgG1-2F8-F405S	34	51	45	39
IgG1-2F8-F405T	35	47	42	46
IgG1-2F8-F405V	36	46	37	43
IgG1-2F8-F405W	17	20	16	18
IgG1-2F8-Y407L	44	41	49	49
IgG1-2F8-Y407W	48	53	47	62
IgG1-2F8-Y407Q	4	9	1	44

Пояснение к таблице 11

Отсутствие (0-3%) биспецифического связывания (-)

Слабое (4-39%) биспецифическое связывание (+/-)

Среднее (40-69%) биспецифическое связывание (+)

Высокое (70-100%) биспецифическое связывание (++)

Из испытываемых мутированных молекул IgG1-2F8 (табл. 11) шесть выбирают для второго анализа для подтверждения результатов, полученных ранее (табл. 11). Несколько мутантов выбирают за их высокую (IgG1-2F8-L368R) и промежуточную (IgG1-2F8-L368W, IgG1-2F8-F405I, IgG1-2F8-F405L и IgG1-2F8-Y407W) эффективность обмена Fab-фрагментами, индуцированного 2-МЕА. Также анализируют IgG1-2F8-Y407Q во второй раз, так как он показывает неожиданно положительную реакцию на индуцируемый 2-МЕА обмен Fab-фрагментами с IgG1-7D8-K409H. Вообще такие результаты, представленные на фиг. 40, подтверждают результаты первого анализа (табл. 11) и показывают, что реакции индуцируемого 2-МЕА обмена Fab-фрагментами мутированных молекул IgG1-2F8 с IgG1-7D8-K409H показывают наивысшую эффективность. Кроме того, реакции индуцируемого 2-МЕА обмена Fab-фрагментами между мутированными молекулами IgG1-2F8 и IgG1-7D8-K409H, которые описаны в примерах 28, 29 и 35-37 как отрицательные, все еще представляют интерес как потенциально промотирующие обмен Fab-фрагментами IgG1, индуцируемый 2-МЕА.

Пример 40. Использование биспецифического формата для удаления нежелательной агонистической активности антагонистических с-Met-антител переводом их в моновалентный биспецифический формат.

Некоторые двухвалентные антитела, разработанные для терапии с моноклональными антителами, проявляют нежелательную активность после связывания со своими мишенями. Это также случается с большинством антител на основе IgG1, направляющихся к рецепторной тиразинкиназе с-Met. Такие агонистические антитела индуцируют димеризацию рецепторов с последующей активацией некоторых нижерасположенных путей передачи сигнала. В результате индуцируется рост и дифференцировка (опухолевых) клеток. Использование формата моновалентных антител может предотвратить индукцию димеризации рецепторов. Комбинация Fab-фрагмента антитела против с-Met с Fab-фрагментом нерелевантного антитела приводит к биспецифическому антителу, которое функционально моновалентно и поэтому является полностью антагонистическим. В данном случае объединяют частично (IgG1-069) или полностью (IgG1-058) агонистическое антитело с IgG1-b12 (впервые описанное Burton D.R. et al., "Efficient neutralisation of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody", Science, 1994, Nov 11, 266(5187): 1024-1027) в биспецифических антителах. IgG1-b12 рассматривают как нерелевантное несвязывающее антитело, так как оно направлено против вирусного белка (HIV-gp120). Антитела против с-Met, используемые в данном эксперименте, являются полностью человеческими моноклональными антителами, полученными в организме трансгенных мышей. IgG1-058 и IgG1-069 связываются с различными эпитопами на с-Met.

Два используемых антитела против с-Met представляют собой антитела IgG1,κ, модифицированные в их Fc-участках, как раскрывается далее. Они имеют приведенные далее переменные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи.

058:

VH 058	EVQLVESGGGLVKGPGSLKLSAASGFTFSDYYMYW VRQTPEKRLEWVATISDDGSYTYYPDSVKGRFTISR NAKNNLYLQMSLKSSEDAMYYCAREGLYYYGSGS YYNQDYWGQGLTVTVSS
VL 053	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGLSSALAWYR QKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFLTIS SLQPEDFATYYCQQFTSYPIITFGQGRLEIK

069:

VH 069	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYFTSYGISW VRQAPGHGLEWGMWISAYNGYTNYAQKLQGRVTM TTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLRGTNYF DYWGQGLTVTVSS
VL 069	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISNWLAWFQ HKPGKAPKLLIYAASLLSGVPSRFSGSGSGTDFLTIS SLQPEDFATYYCQANSFPITFGQGRLEIK

Фосфорилирование рецепторов.

Моновалентные биспецифические антитела к с-Met получают путем реакции обмена Fab-фрагментами с IgG1-058-F405L или IgG1-069-F405L и IgG1-b12-K409R, как описано в примере 23, с использованием 25 мМ 2-МЕА. Оценивают действие биспецифических антител на фосфорилирование с-Met. После димеризации двух соседних с-Met-рецепторов или с помощью природного лиганда HGF или с помощью агонистических двухвалентных антител перекрестно фосфорилируют три тирозиновых остатка (позиции 1230, 1234 и 1235) во внутриклеточном домене с-Met. Это ведет к фосфорилированию некоторых других аминокислот во внутриклеточном домене с-Met и активации ряда каскадов передачи сигналов. Димеризацию и активацию с-Met можно проследить путем использования антител, специфических для фосфорилированного рецептора в указанных позициях, который функционирует как исключенный для потенциального агонизма антител против с-Met.

Клетки A549 CCL-185, полученные из ATCC, выращивают в среде DMEM, содержащей сыворотку, до тех пор, пока не достигнут 70% слияния. Клетки трипсинозируют, промывают и высевают в 6-луночный культуральный планшет в количестве 1*10⁶ клеток/луночку в культуральной среде, содержащей сыворотку. После инкубации в течение ночи клетки обрабатывают или HGF (R&D systems; кат. № 294-HG) (50 нг/мл) или набором антител (30 мкг/мл) и инкубируют в течение 15 мин при 37°C. Клетки дважды промывают охлажденным на льду PBS и лизируют в буфере для лизиса (Cell Signaling; кат. № 9803) с добавлением коктейля ингибиторов протеазы (Roche; кат. № 11836170001). Образцы клеточного лизата хранят при -80°C. Активацию рецепторов определяют путем детекции фосфорилирования с-Met при вестерн-блоттинге с использованием фосфо-с-Met-специфических антител. Белки, присутствующие в клеточном лизате, отделяют на 4-12% геле для SDS-PAGE и переносят на нитроцеллюлозную мембрану, которую затем окрашивают антителами, специфическими для фосфорилированной с-Met (Y1234/1235) (Cell Signaling; кат. № 3129). В качестве контроля загрузки геля определяют общие уровни р-актина и с-Met с использованием антител против с-Met (Cell Signaling; кат. № 3127) и против р-актина (Cell Signaling; кат. № 4967). Результаты вестерн-блоттинга показаны на фиг. 41.

Контроли тканевой культуральной среды и клетки, обработанные одновалентным форматом UniBody® (Genmab, WO 2007059782 и WO 2010063785) антитела 5D5 (Genetech; WO 96/38557), не показывают какого-либо фосфорилирования с-Met-рецепторов. Одновалентный формат UniBody, используемый в данном случае, представляет собой IgG4, в котором шарнирный участок делетирован, и в котором СН3-участок мутирован в позициях 405 и 407. В противоположность этому анализ методом вестерн-блоттинга клеток, обработанных положительным контролем HGF или агонистическими антителами IgG1-058, показывает четкую полосу на ожидаемой высоте фосфорилированной с-Met. Частично агонистические антитела IgG1-069 показывают меньшее, но детектируемое фосфорилирование, что указывает, что происходит некоторая поперечная сшивка рецепторов. Однако как биспецифические антитела IgG1 058/b12, так и биспецифические антитела 069/b12 вовсе не индуцируют фосфорилирование с-Met, что показывает, что агонистическая активность, связанная с исходными антителами, полностью отсутствует (фиг. 41).

Действие антител к с-Met на пролиферацию NCI-H441 in vitro. Возможную пролиферативную агонистическую активность антител к с-Met проверяют in vitro в клеточной линии аденокарциномы легких NCI-H441 (ATCC, HTB-174TM). Такая клеточная линия экспрессирует высокие уровни с-Met, но не продуцирует ее лиганд HGF. Клетки NCI-H441 высевают в 96-луночный планшет для культуры ткани (Greiner bio-one, Frickenhausen, Германия) (5000 клеток/луночку) в RPMI (Lonza) без сыворотки. Антитела

против с-Met разводят до 66,7 нМ в бессывороточной среде RPMI и добавляют к клеткам. После инкубации в течение семи суток при 37°C/5% CO₂ определяют количество жизнеспособных клеток с помощью Alamarblue (BioSource International, San Francisco, US) согласно инструкции изготовителя. Флуоресценцию контролируют с использованием планшетного ридера EnVision 2101 Multilabel (PerkinElmer, Turku, Финляндия) со стандартными настройками на Alamarblue.

В противоположность с IgG1-069 пролиферация не индуцируется после инкубации клеток NCI-H441 с биспецифическим IgG1-069/bl2, как видно на фиг. 42. Также контроль UniBody-069 не индуцирует пролиферацию при сравнении в отсутствие или с обработанным IgG1-b12.

Пример 41. Опосредуемое CDC уничтожение клеток биспецифическими антителами, полученными индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между человеческими IgG1-2F8-F405L или IgG1-7D8-F405L и IgG1-7D8-K409R.

Антитело к CD20 IgG1-7D8 может эффективно убивать клетки, экспрессирующие CD20, за счет комплементзависимой цитотоксичности (CDC). В противоположность этому антителу против EGFR IgG1-2F8 не опосредует CDC на клетках-мишенях, экспрессирующих EGFR. Как IgG1-7D8-K409R, так и биспецифическое антитело, полученное индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8-F405L × IgG1-7D8-K409R, способны индуцировать CDC на клетках, экспрессирующих CD20 (как описано в примере 26). Проверяют, может ли биспецифическое антитело, полученное индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-7D8-F405L и IgG1-7D8-K409R, также индуцировать CDC на клетках, экспрессирующих CD20. Клетки Дауди или Раджи (10⁵) предварительно инкубируют с рядом концентраций антител в 100 мкл среды RPMI с добавлением 0,1% BSA в течение 15 мин на качалке при комнатной температуре. Добавляют 25 мкл сыворотки здорового человека (NHS) в качестве источника комплемента (конечная концентрация 20% NHS), и проводят инкубацию в течение 45 мин при 37°C. После инкубации планшет помещают на лед для прекращения реакции CDC. Погибшие и жизнеспособные клетки различают, добавляя 10 мкл 10 мкг/мл раствор иодида пропидия (PI) (конечная концентрация 0,6 мкг/мл) и анализом FACS.

На фиг. 43 показано, что IgG1-7D8 и биспецифический продукт, полученный индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-7D8-F405L и IgG1-7D8-K409R, имеют одинаковую способность индуцировать опосредуемое CDC уничтожение экспрессирующих CD20 клеток Дауди (фиг. 43A) и Раджи (фиг. 43B). Как клетки Дауди, так и клетки Раджи не экспрессируют EGFR, что приводит к моновалентному связыванию биспецифических антител, полученных индуцированным 2-МЕА обменом Fab-фрагментами между IgG1-2F8-F405L и IgG1-7D8-K409R. Такой биспецифический продукт также индуцирует опосредуемое CDC уничтожение клеток, хотя несколько менее эффективно. Такие данные показывают, что CDC-способность исходного антитела сохраняется в биспецифическом формате. Индукция опосредуемого CDC уничтожения клеток двухвалентным биспецифическим продуктом (IgG1-7D8-F405L × IgG1-7D8-K409R) несколько эффективнее по сравнению с моновалентным биспецифическим продуктом (IgG1-2F8-F405L × IgG1-7D8-K409R). Направляющееся к CD20 антитело 11B8 не способно индуцировать опосредуемое CDC уничтожение клеток и функционирует как отрицательный контроль.

Пример 42. Биспецифические антитела HER2 × HER2 испытывают в анализе *in vitro* каппа-направленного уничтожения ETA'.

Пример показывает, что биспецифические антитела HER2 × HER2 могут доставлять цитотоксическое средство в опухолевые клетки после интернализации в стандартном *in vitro* анализе уничтожения на основе клеток с использованием каппа-направленного экзотоксина A *Pseudomonas* (анти-каппа-ETA'). В таком анализе используют высокоаффинные антитела с анти-каппа-доменом, конъюгированные с усеченной формой экзотоксина A *Pseudomonas*. Подобные слитые белки антителосвязывающих белков (Ig-связывающий мотив из стрептококкового белка A или белка G) и дифтерийного токсина или экзотоксина A *Pseudomonas* существовали ранее (Mazor Y. et al., *J. Immunol. Methods*, 2007, 321: 41-59); Ku S.R. et al., 2009, *Bioconjugate Chem.*, 2009, 20: 1975-1982). Такие молекулы, в противоположность анти-каппа-ETA', связывают Fc-часть полных антител. После интернализации и эндоцитарного сортирования антитела с анти-каппа-доменом подвергают протеолизу и восстановлению дисульфидных связей, отделяя каталитическую форму от связывающего домена. Затем каталитический домен переносят из сети Гольджи в эндоплазматический ретикулум через мотив удерживания KDEL и затем перемещают в цитозоль, где он ингибирует синтез белков и индуцирует апоптоз (Kreitman R.J. et al., *BioDrugs*, 2009, 23: 1-13).

Антитела к HER2, используемые в данном примере и последующих примерах 43-45, являются полностью человеческими моноклональными антителами, полученными в организме трансгенных мышей. Они связываются с различными эпитопами на HER2.

Все они представляют собой антитела IgG1,κ, модифицированные в их Fc-участках так, как раскрывается далее. Они имеют вариабельные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи, указанные далее.

005:

VH 005	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKASGYSFHFYWIGWVRQMPGKGLEWMG SIYPGDS DTRYRPSFQGV TISADKSISTA YLQW TSLKASDTAIYYCARQRG DY YFYGM DVWVGQGT TVTVSS
VL 005	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQVPRLLIYGA SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS- LTFGGGTKVEIK

025:

VH 025	QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGE IHHSNSTYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGYYD SGVYYFDYWAQGT LVTVSS
VL 025	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISRWLAWYQQKPEKAPKSLIYAA SSLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGT RL EIK

153:

VH 153	QVQLVESGGGVVQGRSLRLS CAASGFTFSDYVIHWVRQAPGKGLEWVTV ISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNLSAEDTAMY YCARGG ITGTTGVFDYWGQGT LVTVSS
VL 153	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSWLA WYQQKPEKAPKSLIYDAS SLQSGVPSRFSGSGYGTDFSLTISSLQPEDFAIYYCQQYKSYPI TFGQGT RLEIK

169:

VH 169	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYFTTNYGISWVRQAPGQGLEWMG WLSAYSGNTIYAQKLQGRVTMTDTSTTTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR DRIVVRPDYFDYWGQGT LVTVSS
VL 169	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGT KVEIK

Биспецифические антитела HER2 × HER2 перед инкубацией с клетками A431 предварительно инкубируют с анти-каппа-ETA'. Клетки A431 экспрессируют ~15000 HER2-антител на клетку (определено анализом Qif) и являются нечувствительными к обработке "голыми" HER2-антителами.

Сначала определяют оптимальную концентрацию анти-каппа-ETA' для каждой клеточной линии, т.е. максимально переносимую дозу, которая не ведет к индукции неспецифической гибели клеток. Клетки A431 (2500 клеток/лунку) высевают в нормальную среду для культивирования клеток в 96-луночный планшет для культивирования тканей (Geiner bio-one) и оставляют для прилипания на по меньшей мере 4 ч. Такие клетки инкубируют с серийными разведениями анти-каппа-ETA' 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 и 0 мкг/мл в нормальной среде для культивирования клеток. Через 3 суток определяют число жизнеспособных клеток с помощью Alamarblue (BioSource International, San Francisco, US) согласно инструкции изготовителя. Флуоресценцию контролируют с использованием планшетного ридера EnVision 2101 Multilabel (PerkinElmer, Turku, Финляндия) со стандартными настройками на Alamarblue. Самую высокую концентрацию анти-каппа-ETA', которая сама не убивает клетки (1 мкг/мл для клеток A431), используют для последующих экспериментов.

Затем проверяют действие биспецифических антител HER2 × HER-2 и моноспецифических антител HER2, предварительно инкубированных с анти-каппа-ETA', на их способность индуцировать уничтожение клеток. Клетки A431 высевают так, как описано выше. Получают серийные разведения HER2-специфических антител (моноспецифических и биспецифических антител) и перед добавлением их к клеткам предварительно инкубируют в течение 30 мин с анти-каппа-ETA' в предварительно установленной концентрации. После инкубации в течение 3 суток при 37°C определяют число жизнеспособных клеток, как описано выше. Строят график сигнала Alamarblue клеток, обработанных антителами, предварительно инкубированными с анти-каппа-ETA', в сравнении с клетками, обработанными антителами без обработки. Величины EC₅₀ и максимальную гибель клеток вычисляют с использованием программы GraphPad 5. В качестве положительного контроля уничтожения клеток используют стауроспорин (23,4 мкг/мл). Изотипичные контрольные антитела (IgG1/каппа; IgG1-3G8-QITL) используют в качестве отрицательного контроля.

На фиг. 44 показано, что все биспецифические антитела, предварительно инкубированные с анти-каппа-ETA', способны убивать клетки A431 в зависимости от дозы. Такие результаты показывают, что большинство испытанных биспецифических антител против HER2 являются более эффективными, чем моноспецифические антитела, присутствующие в комбинации в данном анализе с анти-каппа-ETA'. Кроме того, эффективность биспецифических антител 005X169, 015X169 и 153X169 показывает, что эффективность моноспецифического антитела, которое утрачивает активность при таком уничтожении *in vitro*

с анти-каппа-ETA' - HER2-специфического антитела 169, можно повысить через биспецифическую комбинацию с другим HER2-специфическим антителом.

Пример 43. Понижающая модуляция рецептора HER2 путем инкубации с биспецифическими антителами, имеющими мишенью различные эпитопы HER2.

Биспецифические антитела HER2 × HER2 могут связывать различные эпитопы на двух пространственно различных рецепторах HER2. Это может создать возможность другим биспецифическим антителам HER2 × HER2 связываться с остальными эпитопами на указанных рецепторах. Это может привести к поливалентной сшивке рецепторов (по сравнению с димеризацией, вызываемой моновалентными антителами) и впоследствии усилить понижающую модуляцию рецепторов. Для того чтобы исследовать, индуцируют ли биспецифические антитела HER2 × HER2 усиленную понижающую модуляцию HER2, клетки AU565 инкубируют с антителами и биспецифическими антителами в течение трех суток. Определяют общие уровни HER2 и уровни HER2, связанных антителами.

Клетки AU565 высевают в 24-луночный планшет для культивирования тканей (100000 клеток/луночку) в нормальной среде для культивирования клеток и культивируют в течение трех суток при 37°C. в присутствии 10 мкг/мл антител к HER2 или биспецифических антител HER2 × HER2. После промывки PBS клетки лизируют путем инкубации их в течение 30 мин при комнатной температуре с 25 мкл буфера для лизиса Surefire (Perkin Elmer, Turku, Финляндия). Общие уровни белков определяют количественно с использованием аналитического реагента белка бицинхониновой кислоты (BCA) (Pierce), следуя протоколу изготовления. Уровни белка HER2 в лизатах анализируют с использованием HER2-специфического сэндвич-ELISA. Кроличьи античеловеческие антитела к внутриклеточному домену HER2 (Cell Signaling) используют для захвата HER2, и биотинилированные козы античеловеческие поликлональные антитела к HER2 (R&D systems, Minneapolis, США) и затем стрептавидин-поли-HRP используют для детекции связанного HER2. Реакцию визуализируют с использованием 2,2'-азино-бис-3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты (одна таблетка ABTS, разведенная в 50 мл буфера для ABTS [Roche Diagnostic, Almere, Нидерланды]) и останавливают щавелевой кислотой (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Нидерланды). Флуоресценцию при 405 нм измеряют на приборе для прочтения микропланшетов (Biotek Instruments, Winooski, США), и количество HER2 выражают в виде процента относительно необработанных клеток.

Результаты представлены на фиг. 45, на которой показано, что все испытанные биспецифические антитела HER2 × HER2 индуцируют 40% понижающую модуляцию HER2. Представляет интерес, что все биспецифические антитела HER2 × HER2 показывают повышенную понижающую модуляцию HER2 по сравнению с обеими моноспецифическими неотъемлемыми частями.

Пример 44. Солокализация биспецифических антител HER2 × HER2 с лизосомным маркером LAMP1, анализируемая конфокальной микроскопией.

Анализ понижающей модуляции HER2, описанный в примере 43, показывает, что биспецифические антитела HER2 × HER2 способны повышать лизосомную деградацию HER2. Для того чтобы подтвердить такие результаты, применяют технологию конфокальной микроскопии. Клетки AU565 выращивают на покровных стеклах (толщина 1,5 мкм, Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Германия) в стандартной среде для культивирования тканей в течение 3 суток при 37°C. Клетки предварительно инкубируют в течение 1 ч с лейпептином (Sigma) для блокировки лизосомной активности, после чего добавляют 10 мкг/мл моноспецифических антител к HER2 или биспецифических антител HER2 × HER2. Клетки инкубируют еще в течение 3 или 18 часов при 37°C. После этого их промывают PBS и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре с 4% формальдегидом (Klinpath). Слайды промывают буфером для блокировки (PBS с добавлением 0,1% сапонина [Roche] и 2% BSA [Roche]) и инкубируют в течение 20 мин с буфером для блокировки, содержащим NH₄Cl, для гашения формальдегида. Слайды снова промывают буфером для блокировки и инкубируют в течение 45 мин при комнатной температуре с мышинным античеловеческим CD107a (LAMP1) (BD Pharmingen) для окрашивания лизосом. После промывки буфером для блокировки слайды инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре с коктейлем из вторичных антител козьего антимышиного IgG-Cy5 (Jackson) и козьего античеловеческого IgG-FITC (Jackson). Слайды снова промывают буфером для блокировки и заливают в течение ночи в микроскопические препараты с использованием 20 мкл заливочной среды (6 г глицерина [Sigma] и 2,4 г мовиола 4-88 [Omnilabo] растворяют в 6 мл дистиллированной воды, к которой добавляют 12 мл 0,2 М трис [Sigma], pH 8,5, с последующей инкубацией в течение 10 мин при 60-60°C; заливочную среду делят на аликвоты и хранят при -20°C). Слайды визуализируют с помощью конфокального микроскопа Leica SPE-II (Leica Microsystems), снабженного масляными линзами иммерсионного объектива 63x 1,32-6, и программы LAS-AF. Для возможности количественного определения перекрывающихся пиксельной интенсивностей следует избегать насыщенности пикселей. Поэтому интенсивность лазера FITC снижают на 10%, смарт-усиление устанавливают на 830 В и смарт-смещение устанавливают на -9,48%. С использованием такой настройки биспецифические антитела четко визуализируются без насыщенности пикселей, но моноспецифические антитела иногда затруднительно детектировать. Для того чтобы сравнить лизосомную солокализацию между моноспецифическими и биспецифическими антителами, такие настройки поддержи-

вают одними и теми же для всех анализируемых конфокальных слайдов.

На солокализацию анализируют изображения 12-бит с использованием программы MetaMorph (версия Meta Series 6.1, Molecular Devices Inc., Sunnyvale California, США). Изображения FITC и Cy5 привносятся в виде наборов, и фон вычитают. Используют идентичные пороговые настройки (ручная настройка) для всех изображений FITC и всех изображений Cy5. Солокализацию выражают как пиксельную интенсивность FITC в области перекрывания (ROI), где ROI составляют из всех Cy5-положительных участков. Для того чтобы сравнить различные слайды, окрашенные несколькими антителами к HER2 или биспецифическими антителами HER2 × HER2, изображения нормализуют с использованием пиксельной интенсивности Cy5. Козий антимышиный IgG-Cy5 используют для окрашивания лизосомного маркера LAMP1 (CD107a). Пиксельная интенсивность LAMP1 не должна различаться для различных испытываемых антител к HER2 или биспецифических антител HER2 × HER2 (одна клетка имеет пиксельную интенсивность Cy5 приблизительно 200000).

Нормализованные величины для солокализации FITC и Cy5 = $[(TPI-FITC \text{ [процент солокализации FITC-Cy5]}/100)] \times [200000/TP1-Cy5]$.

В данной формуле TPI обозначает общую пиксельную интенсивность, представляет процент жизнеспособных клеток при измерении пиксельной интенсивности FITC, перекрывающейся с Cy5, для различных моноспецифических антител к HER2 или биспецифических антител HER2 × HER2. Для каждого антитела анализируют три различных изображения с одного слайда, содержащего ~1,3 или >5 клеток. Значимую вариацию наблюдают между различными изображениями в пределах каждого слайда. Однако очевидно, что все биспецифические антитела HER2 × HER2 демонстрируют повышенную солокализацию с лизосомным маркером LAMP1 по сравнению с их моноспецифическими частями. Такие результаты показывают, что будучи интернализированы, биспецифические антитела HER2 × HER2 эффективно связываются с лизосомными компартментами, делая их подходящими для подхода к конъюгатам лекарственных средств на основе биспецифических антител.

Пример 45. Ингибирование пролиферации клеток AU565 после инкубации с моноспецифическими антителами к HER2 или биспецифическими антителами HER2 × HER2.

Биспецифические антитела HER2 × HER2 испытывают на их способность ингибировать пролиферацию клеток AU565 *in vitro*. Из-за высоких уровней экспрессии HER2 на клетках AU565 (~1000000 копий на клетку при определении с Qifi-kit) HER2 конститутивно активен в таких клетках и, таким образом, не зависит от лигандиндуцированной гетеродимеризации. В 96-луночный планшет для культивирования тканей (Greiner bio-one, Frickenhausen, Германия) высевают 9000 клеток AU565 на лунку в присутствии 10 мкг/мл антител к HER2 или биспецифических антител HER2 × HER2 в бессывороточной культуральной среде. В качестве контроля высевают клетки в бессывороточной среде без антител или биспецифических антител. Через трое суток определяют количество жизнеспособных клеток с Alamarblue (BioSource International, San Francisco, US) согласно инструкциям изготовителя. Флуоресценцию контролируют с использованием планшетного ридера EnVision 2101 Multilabel (PerkinElmer, Turku, Финляндия) со стандартными настройками на Alamarblue. Сигнал Alamarblue клеток, обработанных антителами, отражают на графике как процент относительно необработанных клеток.

На фиг. 47 отобразена интенсивность флуоресценции Alamarblue клеток AU565 после инкубации с антителами к HER2 и биспецифическими антителами HER2 × HER2. В качестве положительного контроля включают герцептин® (трастузумаб), и показано ингибирование пролиферации так, как описано в Juntilla T.T. et al., *Cancer Cell*, 2009, 15: 429-440. Все биспецифические антитела HER2 × HER2 способны ингибировать пролиферацию клеток AU565. В таком анализе биспецифические антитела IgG1-005-ITL × IgG1-169-K409R и IgG1-025-ITL × IgG1-005-K409R более эффективны по сравнению с составляющими их моноспецифическими антителами.

Пример 46. Анализ *in vitro* и *in vivo* связывания FcRn биспецифическими антителами IgG1 и биспецифическими антителами IgG1 с делетированным шарнирным участком, содержащими один или два сайта связывания в Fc-участке.

Данный пример иллюстрирует образование асимметричных биспецифических молекул по изобретению с различными характеристиками в каждом Fab-фрагменте.

Неонатальный рецептор Fc (FcRn) ответственен за длительный период полувыведения IgG из плазмы, защищая IgG от разрушения. После интернализации антитела FcRn связывается с Fc-участками антитела в эндосомах, где взаимодействие устойчиво в умеренно кислой среде (pH 6,0). После рециклинга в плазматическую мембрану, где среда нейтральная (pH 7,4), взаимодействие утрачивается, и антитело снова высвобождается в кровотоки. Участок Fc антитела содержит сайты связывания FcRn один на каждой тяжелой цепи на границах раздела CH2-CH3. Мутация H435A в Fc-участке антитела отменяет связывание с FcRn (Shields R.L. et al., *J. Biol. Chem.*, 2001; Firan M. et al., *Int. Immunol.*, 2001), и также полагают, что на связывание FcRn влияет шарнирный участок (Kim J.K. et al., *Mol. Immunol.*, 1995). Кроме того, в эффективном рециклинге для связывания с FcRn предполагается большая роль для двухвалентного антитела, а не моновалентного (Kim J.K. et al., *Scand. J. Immunol.*, 1994).

В данном примере влияние валентности на связывание FcRn оценивают с помощью асимметричных

молекул биспецифического IgG1, содержащего единственный сайт связывания FcRn. Дополнительный вклад шарнирного участка оценивают с помощью асимметричных молекул биспецифического IgG1 с делегированным шарнирным участком (Uni-G1).

Связывание FcRn молекул биспецифического IgG1 или биспецифического IgG1 с делегированным шарнирным участком (Uni-G1) без сайта связывания FcRn, содержащих 1 или 2 сайта связывания FcRn, измеряют ELISA человеческого и мышиноного FcRn. Моноспецифические молекулы антител IgG1-2F8-ITL, IgG1-7D8-K409R и IgG1-7D8-K409R-H435A получают так, как описано в примерах 2, 3, 4 и 5. Моноспецифические молекулы IgG1 с делегированным шарнирным участком Uni-G1-2F8-ITL, Uni-G1-7D8-K409R и Uni-G1-7D8-K409R-H435A получают так, как описано в примере 11. Биспецифические молекулы IgG1 получают индуцированным 2-MEA обменом Fab-фрагментами между молекулами IgG1-2F8-ITL и IgG1-7D8-K409R или IgG1-7D8-K409R-H435A. Биспецифические молекулы IgG1 с делегированным шарнирным участком получают инкубацией Uni-G1-2F8-ITL с Uni-G1-7D8-K409R или Uni-G1-7D8-K409R-H435A. Серийные 3-кратные разведения моноспецифических и биспецифических молекул IgG1 и молекул IgG1 с делегированным шарнирным участком добавляют к биотинилированному человеческому или мышиноному FcRn, захваченному на планшете для ELISA, сенсибилизированном стрептавидином, с последующей инкубацией при pH 6,0 и 7,4 в течение 1 ч. Связанные молекулы антител и IgG1 с делегированным шарнирным участком визуализируют с использованием в качестве конъюгата козьего античеловеческого (Fab')₂, меченного пероксидазой из хрена, и ABTS в качестве субстрата. Результаты измеряют как оптическую плотность при длине волны 405 нм с использованием планшетного ридера для ELISA EL808.

На фиг. 28 показаны результаты по связыванию моновалентных или двухвалентных антител IgG1 и молекул IgG1 с делегированным шарнирным участком с человеческим FcRn (A) или мышинным FcRn (B) при pH 6,0 и 7,4. Как ожидалось, все испытываемые антитела, как (биспецифический) IgG1, так и молекулы IgG1 с делегированным шарнирным участком не связываются эффективно с FcRn (как человеческим, так и мышинным) при pH 7,4. В слабнокислой среде (pH 6,0) моноспецифический IgG1-2F8-ITL и биспецифический IgG1, образованный из IgG1-2F8-ITL и IgG1-7D8-K409R, проявляет эффективное двухвалентное связывание с FcRn, хотя в случае мышиноного FcRn в 3 раза большее по сравнению с человеческим, которая напоминает положительный контроль (IgG1-2F8) для связывания FcRn. Это показывает, что мутации ITL и K409R не нарушают связывание с FcRn.

Можно видеть четкое влияние 2 против 1 против 0 сайтов связывания FcRn, когда связывание молекул IgG1 с человеческим и мышинным FcRn сравнивают при pH 6,0 (фиг. XXA и B, pH6, левая сторона). IgG1-2F8-ITL, IgG1-7D8-K409R и IgG1-2F8-ITL/IgG1-7D8-K409R (2 сайта связывания FcRn) связываются сравнимо с контролем (IgG1-2F8). Молекулы IgG1-7D8-K409R-H435A с 0 сайтов связывания FcRn совсем не показывают связывания. Молекулы IgG1-2F8-ITL/IgG1-7D8-K409R-H435A с 1 сайтом связывания FcRn показывают промежуточное связывание при сравнении с молекулами с 2 сайтами связывания FcRn.

На фиг. 48(A), pH 6,0, справа показано связывание с человеческим FcRn молекул IgG1 с делегированным шарнирным участком (Uni-G1). Все молекулы с делегированным шарнирным участком слабее взаимодействуют с человеческим FcRn при сравнении с молекулами контрольного IgG1 (IgG1-2F8), что показывает, что шарнирный участок действительно влияет на взаимодействие с FcRn при оценке на связывание с FcRn ELISA. Не видно четкого влияния 2 против 1 против 0 сайтов связывания FcRn, когда сравнивают связывание с человеческим FcRn при pH 6,0 таких молекул с делегированным шарнирным участком.

Однако, так как связывание человеческого IgG с мышинным FcRn сильнее, четкое влияние 2 против 1 против 0 сайтов связывания FcRn можно видеть, когда сравнивают связывание таких молекул IgG1 с делегированным шарнирным участком с мышинным FcRn при pH 6,0 (фиг. 48(B), pH 6,0, правая сторона). Связывание Uni-G1-7D8-K409R-H435A/Uni-G1-2F8-ITL (1 сайт связывания FcRn) является промежуточным при сравнении со связыванием Uni-G1-2F8-ITL, Uni-G1-7D8-K409R и Uni-G1-2F8-ITL/Uni-G1-7D8-K409R (2 сайта связывания FcRn) и Uni-G1-2F8-ITL-H435A (0 сайтов связывания FcRn, связывание отсутствует).

Пример 47. Биспецифические антитела Her2 × CD3 испытывают в анализе на цитотоксичность *in vitro* CD3 является рецептором в Т-клеточном рецепторном комплексе, экспрессируемом на зрелых Т-клетках. Объединение Fab-фрагмента CD3-специфического антитела с Fab-фрагментом опухолевого антигенспецифического антитела в биспецифическом антителе может привести к специфическому нацеливанию Т-клеток на опухолевые клетки, что ведет к опосредуемому Т-клетками лизису опухолевых клеток. Подобным образом, CD3-положительные Т-клетки можно было бы нацелить на другие разрушительные для организма клетки, на инфицированные клетки или непосредственно на патогены.

Получают биспецифические антитела Her2 × CD3. Последовательности переменных участков тяжелых и легких цепей для Her2-специфического Fab-фрагмента для антител 153 и 169 показаны в примере 42. Используют последовательности переменных участков тяжелых и легких цепей, показанные далее.

YTH12.5 (последовательность, описанная Routledge et al., *Eu. J. Immunol.*, 1991, 21(11): 2717-25)

VH YTH12.5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFPMAWVRQAPGKGLEW VSTISTSGGRITYYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKFRQYSGGFDYWGGTGLTVSS
VL YTH12.5	DIQLTQPNVSTSLGSLVTKLSTLSSGNIENNYVHWYQLYEGRSPTTMI YDDDKRPDGVDPDRFSGSIDRSSNSAFLTIHNVVAIEDEAIYFCHSYVSSFN VFGGGTKLTVL

huCLB-T3/4 (последовательность, описанная Parren et al., *Res. Immunol.*, 1991, 142(9): 749-63; вводят минорные замены аминокислот и получают последовательность, схожую с ближайшей человеческой зародышевой линией)

VH huCLB- T3/4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMFWVRQAPGKGLEW VATISRYRYIYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CARRPLYGSSPDYWGGTGLTVSS
VL huCLB- T3/4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVTYVHWYQKPGQAPRLIYD TSKLAGIPARFSGSGSDFTLTISLEPEDFAVYYCFQSGGYPLTFGS GTKLEMR

Все антитела экспрессируют в виде IgG1,κ, причем модифицируют в их Fc-участках так, как описано, следующим образом: IgG1-Her2-153-K409R и IgG1-Her2-153-N297Q-K409R, IgG1-Her2-169-K409R, IgG1-hu-CLB-T3/4-F405L и IgG1-hu-CLB-T3/4-N297Q-F405L, IgG1-YTH12.5-F405L и IgG1-YTH12.5-N297Q-F405L.

Биспецифические антитела из таких Her2- и CD3-специфических антител получают так, как описано в примере 11, и испытывают в анализе на цитотоксичность *in vitro* с использованием клеток AU565.

Клетки AU565 культивируют почти до слияния. Клетки дважды промывают PBS и трипсинизируют в течение 5 мин при 37°C. Добавляют 12 мл культуральной среды для инактивации трипсина, и клетки центрифугируют в течение 5 мин, 800 об/мин. Клетки снова суспендируют в 10 мл культуральной среды и получают суспензию отдельных клеток, пропуская клетки через клеточный фильтр. В каждую лунку 96-луночного культурального планшета добавляют по 100 мкл суспензии 5×10^5 клеток/мл, и клетки инкубируют по меньшей мере 3 ч при 37°C, 5% CO₂, для прилипания к планшету.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяют из крови здоровых добровольцев с использованием 30-мл пробирок Leucoser согласно протоколу изготовителя (Greiner Bio-one). Из препаратов PBMC выделяют Т-клетки отрицательной селекцией с использованием набора Untouched Human T-cells Synabead (Dyna). Изолированные клетки снова суспендируют в культуральной среде до конечной концентрации 7×10^6 клеток/мл.

Культуральную среду удаляют из прилипших клеток AU565 и заменяют 50 мкл/лунку 2х разведения концентрированных антител и 50 мкл/лунку 7×10^6 Т-клеток/мл (отношение эффектор/мишень = 7:1). Планшеты инкубируют в течение 3 суток при 37°C, 5% CO₂. Супернатанты удаляют и планшеты дважды промывают PBS. В каждую лунку добавляют 150 мкл культуральной среды и 15 мкл Alamar blue. Планшеты инкубируют в течение 4 ч при 37°C, 5% CO₂, и измеряют поглощение (Envision, Perkin Elmer).

На фиг. 49 показано, что в то время, как контрольные антитела (Her2-моноспецифический IgG1-герцептин, CD3-моноспецифический IgG1-YTH12.5 и моноспецифический IgG1-huCLB-T3/4, нерелевантный антигенмоноспецифический IgG1-b12 и биспецифические антитела CD3 × b12) не индуцируют опосредуемую Т-клетками цитотоксичность, биспецифические антитела (Duo) Her2 × CD3 huCLB/Her2-153, huCLB/Her2-169, YTH12.5/Her2-153 и YTH12.5/Her2-169 индуцируют зависимую от дозы опосредуемую Т-клетками цитотоксичность клеток AU565. Биспецифические антитела, содержащие Her2-169, более сильные, чем антитела, содержащие Her2-153.

Получают мутанты IgG1-hu-CLB-T3/4, IgG1-YTH12.5 и Her2-153, содержащие мутацию N297Q, для удаления сайта гликозилирования; гликозилирование в указанном сайте критично для взаимодействий IgG-Fc-гамма-рецепторов (Bolt S. et al., *Eur. J. Immunol.*, 1993, 23: 403-411). На фиг. 49 показано, что мутация N297Q и, следовательно, отсутствие гликозилирования биспецифических антител Her2 × CD3 YTH12.5/Her2-153 и huCLB/Her2-153 не оказывают воздействия на потенциал индуцирования зависимой от дозы опосредуемой Т-клетками цитотоксичности клеток AU565.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ *in vitro* получения гетеродимерного белка, включающий следующие стадии:
 - a) предоставление первого гомодимерного IgG антитела, включающего первый СН3-участок, где указанное первое гомодимерное IgG антитело имеет аминокислоту Arg в положении 409,
 - b) предоставление второго гомодимерного IgG антитела, включающего второй СН3-участок, где указанное второе IgG антитело имеет замену аминокислоты в позиции, выбранной из группы, состоящей из:
 - (i) Ala, Glu, Gly, His, Ile, Gln, Arg, Asp, Asn, Ser, Thr, Val или Trp в положении 368, или
 - (ii) Ala, Phe, Arg, Tyr, His или Lys в положении 399, или
 - (iii) Ala, Asp, Glu, His, Ile, Met, Asn, Gln, Thr, Val, Tyr, Leu, Lys, Ser или Trp в положении 405, или

- (iv) Gly, Leu, Met или Trp в положении 407, и последовательности указанных первого и второго СНЗ-участков являются различными и таковы, что гетеродимерное взаимодействие между указанными первым и вторым СНЗ-участками сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанных первого и второго СНЗ-участков, и где последовательности обоих указанных первого и второго гомодимерных антител содержат последовательность Cys-Pro-Pro-Cys в области шарнира,
- с) инкубацию указанного первого антитела вместе с указанным вторым антителом в восстановительных условиях, достаточных для того, чтобы дать возможность цистеинам в шарнирном участке претерпевать изомеризацию дисульфидной связи, тем самым получая указанный гетеродимерный белок.
2. Способ *in vitro* по п.1, при этом восстановительные условия на стадии с) включают добавление восстановителя, например восстановителя, выбранного из группы, состоящей из 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис(2-карбоксиэтил)фосфина или их химических производных.
3. Способ *in vitro* по п.1 или 2, при этом стадию с) выполняют в восстановительных условиях с окислительно-восстановительным потенциалом от -150 до -600 мВ, таком как от -250 до -400 мВ.
4. Способ *in vitro* по любому из пп.1-3, при этом стадия с) включает инкубацию в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20°C в присутствии по меньшей мере 25 мМ 2-меркаптоэтиламина или в присутствии по меньшей мере 0,5 мМ дитиотреитола.
5. Способ *in vitro* по любому из пп.1-4, при этом стадия d) включает удаление восстановителя, например, обессоливанием.
6. Способ получения гетеродимерного белка, включающий следующие стадии:
- предоставление первой нуклеотидной конструкции, кодирующей первое гомодимерное IgG антитело, включающее первый СНЗ-участок,
 - предоставление второй нуклеотидной конструкции, кодирующей второе гомодимерное IgG антитело, включающее второй СНЗ-участок, при этом последовательности указанных первого и второго СНЗ-участков являются различными и таковы, что гетеродимерное взаимодействие между указанными первым и вторым СНЗ-участками сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанных первого и второго СНЗ-участков, и где указанное первое гомодимерное IgG антитело имеет аминокислоту Arg в положении 409, где указанное второе гомодимерное IgG антитело имеет замену аминокислоты в позиции, выбранной из группы, состоящей из:
 - Ala, Glu, Gly, His, Ile, Gln, Arg, Asp, Asn, Ser, Thr, Val или Trp в положении 368, или
 - Ala, Phe, Arg, Tyr, His или Lys в положении 399, или
 - Ala, Asp, Glu, His, Ile, Met, Asn, Gln, Thr, Val, Tyr, Leu, Lys, Ser или Trp в положении 405, или
 - Gly, Leu, Met или Trp в положении 407;
 - коэкспрессия указанных первой и второй нуклеотидных конструкций в клетке-хозяине, и
 - изолирование указанного гетеродимерного белка из клеточной культуры.
7. Способ по п.6, при этом стадия с) также включает коэкспрессию в указанной клетке-хозяине одной или нескольких нуклеотидных конструкций, кодирующих легкую цепь.
8. Способ по любому из пп.1-7, при этом указанные первый и второй гомодимерные IgG антитела имеют специфичность связывания с различными эпитопами.
9. Способ по любому из пп.1-8, при этом Fc-участок первого гомодимерного IgG антитела является участком изотипа, выбранного из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и при этом Fc-участок второго гомодимерного IgG антитела является участком изотипа, выбранного из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.
10. Способ по любому из пп.1-9, при этом Fc-участки обоих указанных первого и второго гомодимерных IgG антител являются участками изотипа IgG1.
11. Способ по любому из пп.1-10, при этом один из Fc-участков указанных гомодимерных IgG антител имеет изотип IgG1 и другой изотип IgG4.
12. Способ по любому из пп.1-11, при этом гетеродимерное взаимодействие между указанными первым и вторым СНЗ участками в полученном гетеродимерном антителе таково, что обмен Fab-фрагментами не может происходить при 37°C в течение 24 ч в 0.5 мл PBS (натрий-фосфатный буфер), содержащий 0.5 мкМ глутатиона.
13. Способ по любому из пп.1-12, при этом гетеродимерное взаимодействие между указанными первым и вторым СНЗ участками в полученном гетеродимерном IgG антителе таково, что обмен Fab-фрагментами не происходит *in vivo* у мышей, когда гетеродимерное IgG антитело и 10-кратный избыток нерелевантного IgG4 (натализумаб, анти- α 4-интегрин) вводятся внутривенно.
14. Способ по любому из пп.1-13, при этом гетеродимерное взаимодействие между указанными первым и вторым СНЗ участками в полученном гетеродимерном IgG антителе более чем в два раза сильнее, чем самое сильное из двух гомодимерных взаимодействий.
15. Способ по любому из пп.1-14, при этом последовательности указанных первого и второго СНЗ-участков таковы, что константа диссоциации гетеродимерного взаимодействия между указанными первым и вторым Fc участками в полученном гетеродимерном белке составляет ниже 0,05 микромоляр.

16. Способ по любому из пп.1-15, при этом последовательности указанных первого и второго СНЗ-участков таковы, что константы диссоциации обоих гомодимерных взаимодействий превышают 0,01 микромоляр.

17. Способ по любому из пп.1-16, при этом заменяющие аминокислоты являются природными аминокислотами или неприродными аминокислотами.

18. Способ по любому из пп.1-17, при этом указанное первое гомодимерное IgG антитело имеет не более одной замены аминокислоты в СНЗ-участке и второе гомодимерное IgG антитело имеет не более одной замены аминокислоты в СНЗ-участке относительно СНЗ-участков дикого типа.

19. Способ по любому из пп.1-18, при этом указанное первое гомодимерное IgG антитело включает Phe в позиции 405 и Arg в позиции 409 и указанное второе гомодимерное IgG антитело включает в позиции 405 аминокислоту иную, чем Phe, Arg или Gly, и Lys в позиции 409.

20. Способ по любому из пп.1-19, при этом указанное первое гомодимерное IgG антитело включает Phe в позиции 405 и Arg в позиции 409 и указанное второе гомодимерное IgG антитело включает Leu в позиции 405 и Lys в позиции 409.

21. Способ по любому из пп.1-20, при этом указанное первое гомодимерное IgG антитело включает Arg в позиции 409 и указанное второе гомодимерное IgG антитело включает Lys в позиции 409, Thr в позиции 370 и Leu в позиции 405.

22. Способ по любому из пп.1-21, при этом указанное первое гомодимерное IgG антитело включает Lys в позиции 370, Phe в позиции 405 и Arg в позиции 409 и указанный второе гомодимерное IgG антитело включает Lys в позиции 409, Thr в позиции 370 и Leu в позиции 405.

23. Способ по любому из пп.1-22, при этом указанное первое гомодимерное IgG антитело имеет Tyr в позиции 407 и Arg в позиции 409 и указанное второе гомодимерное IgG антитело имеет в позиции 407 аминокислоту иную, чем Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser или Thr, и Lys в позиции 409.

24. Способ по любому из пп.1-23, при этом указанное первое гомодимерное IgG антитело имеет Tyr в позиции 407 и Arg в позиции 409 и указанное второе гомодимерное IgG антитело имеет Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val или Trp в позиции 407 и Lys в позиции 409.

25. Способ по любому из пп.1-24, при этом указанное первое гомодимерное IgG антитело имеет Tyr в позиции 407 и Arg в позиции 409 и указанное второе гомодимерное IgG антитело имеет Gly, Leu, Met, Asn или Trp в позиции 407 и Lys в позиции 409.

26. Способ по любому из пп.1-25, при этом указанные первый и второй СНЗ-участки, за исключением аминокислотных замен в положениях 368, 399, 405, 407 и 409, включают последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1.

27. Способ по любому из пп.1-26, при этом указанные первый и второй гомодимерные IgG антитела, за исключением аминокислотных замен в положениях 368, 399, 405, 407 и 409, представляют собой человеческие или гуманизированные антитела IgG.

28. Способ по любому из пп.1-27, при этом как указанное первое, так и указанное второе гомодимерные IgG антитела также включают легкую цепь.

29. Способ по п.28, при этом указанные легкие цепи являются различными.

30. Способ по любому из пп.1-28, при этом указанное первое и/или указанное второе гомодимерное IgG антитело включает мутацию, удаляющую акцепторный сайт для Asp-связанного гликозилирования.

31. Способ по любому из пп.1-29, при этом указанные первое и второе гомодимерные IgG антитела, предоставляемые на стадии а) и б), очищают.

32. Способ по любому из пп.1-30, при этом указанное первое и/или указанное второе гомодимерные IgG антитела конъюгированы с лекарственным средством, пролекарством или токсином или содержат акцепторную группу для них.

33. Способ по любому из пп.8-31, при этом указанный первый и/или указанный второй эпитоп локализован на опухолевой клетке.

34. Способ по любому из пп.8-32, при этом указанный первый или указанный второй эпитоп локализован на опухолевой клетке и другой эпитоп локализован на эффекторной клетке.

35. Способ по любому из пп.8-33, при этом эпитоп локализован на Т-клетке, например на CD3, экспрессированном на Т-клетке.

36. Способ по любому из пп.8-34, при этом указанный первый или указанный второй эпитоп локализован на опухолевой клетке и другой эпитоп локализован на радиоизотопе, токсине, лекарственным средством или пролекарстве, которые необязательно могут быть в сочетании или соединены с пептидом или гаптенем.

37. Способ по любому из пп.8-35, при этом указанный первый или указанный второй эпитоп локализован на опухолевой клетке и другой эпитоп локализован на электронно-плотной везикуле или мини-клетке.

38. Способ по любому из пп.1-36, при этом оба гомодимерных IgG антитела связываются с различными эпитопами на одной и той же опухолевой клетке.

39. Способ отбора биспецифического антитела с нужным свойством, включающий стадии:

а) предоставления первого набора гомодимерных IgG антител, включающих антитела с различными

вариабельными участками, при этом указанные антитела из указанного первого набора включают идентичные первые СНЗ-участки,

b) предоставления второго набора гомодимерных IgG антител, включающих антитела с различными вариабельными участками или идентичными вариабельными участками, при этом указанные антитела из указанного второго набора включают идентичные вторые СНЗ-участки, где указанное первое гомодимерное IgG антитело имеет аминокислоту Arg в положении 409, где указанное второе гомодимерное IgG антитело имеет замену аминокислоты в позиции, выбранной из группы, состоящей из:

- (i) Ala, Glu, Gly, His, Ile, Gln, Arg, Asp, Asn, Ser, Thr, Val или Trp в положении 368, или
- (ii) Ala, Phe, Arg, Tyr, His или Lys в положении 399, или
- (iii) Ala, Asp, Glu, His, Ile, Met, Asn, Gln, Thr, Val, Tyr, Leu, Lys, Ser или Trp в положении 405, или
- (iv) Gly, Leu, Met или Trp в положении 407,

при этом последовательности указанных первых и вторых СНЗ-участков являются различными и таковы, что гетеродимерное взаимодействие между указанными первыми и вторыми СНЗ-участками сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанных первых и вторых СНЗ-участков,

c) инкубации комбинаций антител из указанного первого набора и указанного второго набора в восстановительных условиях, достаточных для возможности для цистеинов в шарнирном участке претерпевать изомеризацию дисульфидных связей, причем таким образом образуется набор биспецифических антител,

e) анализа полученного набора биспецифических антител на заданное нужное свойство, и

f) отбора биспецифического антитела с нужным свойством.

40. Способ по п.39, где стадия (c) также предусматривает возврат к невозстанавливающим условиям.

41. Способ по п.40, где указанный возврат к невозстанавливающим условиям предусматривает удаление восстанавливающего агента, например обессоливанием.

42. Способ по любому из пп.39-41, при этом гомодимерные антитела из второго набора имеют различные вариабельные участки.

43. Способ по любому из пп.39-41, при этом гомодимерные антитела из второго набора имеют идентичные вариабельные участки, но имеют различные аминокислотные или структурные вариации вне антигенсвязывающего участка.

44. Экспрессирующий вектор, включающий нуклеотидные конструкции, кодирующие гомодимерное IgG антитело, охарактеризованное в любом из пп.6-38.

45. Клетка-хозяин для экспрессии антител, включающая нуклеотидные конструкции, кодирующие гомодимерное IgG антитело, охарактеризованное в любом из пп.6-38.

46. Гетеродимерное антитело, полученное способом по любому из предшествующих пп.1-43.

47. Гетеродимерное антитело, включающее первый полипептид, включающий первый Fc-участок первого IgG антитела, причем указанный первый Fc-участок включает первый СНЗ-участок, и второй полипептид, включающий второй Fc-участок второго IgG антитела, причем указанный второй Fc-участок включает второй СНЗ-участок, при этом последовательности указанных первого и второго СНЗ-участков являются различными и таковы, что гетеродимерное взаимодействие между указанными первым и вторым СНЗ-участками сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанных первого и второго СНЗ-участков, и где указанный первый СНЗ участок имеет аминокислоту Arg в положении 409, где указанный второй СНЗ участок имеет замену аминокислоты в позиции, выбранной из группы, состоящей из:

- (i) Ala, Glu, Gly, His, Ile, Gln, Arg, Asp, Asn, Ser, Thr, Val или Trp в положении 368, или
- (ii) Ala, Phe, Arg, Tyr, His или Lys в положении 399, или
- (iii) Ala, Asp, Glu, His, Ile, Met, Asn, Gln, Thr, Val, Tyr, Leu, Lys, Ser или Trp в положении 405, или
- (iv) Gly, Leu, Met или Trp в положении 407.

48. Гетеродимерное антитело по п.47, в котором указанный первый СНЗ-участок имеет Phe в положении 405, Arg в позиции 409 и указанный второй СНЗ-участок имеет Leu в позиции 405 и Lys в положении 409.

49. Гетеродимерное антитело по п.47 или 48, также включающий две полноразмерные легкие цепи.

50. Гетеродимерное антитело по любому из предшествующих пп.46-49, где указанное первое и указанное второе гомодимерные IgG антитела имеют специфичность связывания с различными эпитопами.

51. Гетеродимерное антитело по любому из предшествующих пп.46-49, которое является биспецифическим антителом.

52. Гетеродимерное антитело по любому из предшествующих пп.46-51, где Fc область первого гомодимерного IgG антитела относится к изотипу, выбранному из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и где Fc область второго гомодимерного IgG антитела относится к изотипу, выбранному из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

53. Гетеродимерное антитело по любому из предшествующих пп.46-52, где Fc-участки обоих указанных первого и указанного второго IgG антител являются участками изотипа IgG1.

54. Гетеродимерное антитело по любому из предшествующих пп.46-52, где один из Fc-участков указанных IgG антител относится к изотипу IgG1, а другой - к изотипу IgG4.

55. Гетеродимерное антитело по любому из предшествующих пп.46-54, где указанное первое IgG

антитело имеет не более одной аминокислотной замены в области СН3 и указанное второе IgG антитело имеет не более одной аминокислотной замены в области СН3 относительно областей СН3 дикого типа.

56. Гетеродимерное антитело по любому из предшествующих пп.46-55, где указанные первое и второе IgG антитела, за исключением аминокислотных замен в положениях 368, 399, 405, 407 и 409, являются человеческими или гуманизированными антителами IgG.

57. Гетеродимерное антитело по любому из предшествующих пп.46-56, где указанные первое и второе IgG антитела конъюгированы с лекарством, пролекарством или токсином или содержат акцепторную группу для них.

58. Гетеродимерное антитело по любому из предшествующих пп.50-57, при этом указанный первый и/или указанный второй эпитоп локализован на опухолевой клетке.

59. Гетеродимерное антитело по любому из предшествующих пп.50-58, при этом указанный первый или указанный второй эпитоп локализован на опухолевой клетке и другой эпитоп локализован на эффекторной клетке.

60. Гетеродимерное антитело по любому из предшествующих пп.50-59, при этом эпитоп локализован на Т-клетке, например на CD3, экспрессированном на Т-клетке.

61. Гетеродимерное антитело по любому из пп.47-58, при этом указанное первое и второе IgG антитела связываются с различными эпитопами на одной и той же опухолевой клетке.

62. Гетеродимерное антитело по любому из предшествующих пп.51-56, где указанное биспецифическое антитело имеет специфичность связывания к первому и второму эпитомам, где указанные первый и второй эпитопы расположены на опухолевой клетке и где биспецифическое антитело имеет специфичность связывания с мишенью, выбранной из группы, состоящей из: erbB1 (EGFR), erbB2 (HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD19, CD20, CD4, CD38, CD138, CXCR5, c-Met, HERV-envelop protein, periostin, Bigh3, SPARC, BCR, CD79, CD37, EGFrvIII, L1-CAM, AXL, тканевого фактора (TF), CD74, EpCAM и MRP3.

63. Гетеродимерное антитело по любому из предшествующих пп.51-56, где указанное биспецифическое антитело имеет специфичность связывания к первому и второму эпитомам, где указанные первый и второй эпитопы расположены на опухолевой клетке и где указанное биспецифическое антитело имеет специфичность связывания с целевой комбинацией, выбранной из группы, состоящей из: erbB1 + erbB2, erbB2 + erbB3, erbB1 + erbB3, CD19 + CD20, CD38 + CD34, CD4 + CXCR5, CD38 + RANKL, CD38 + CXCR4, CD20 + CXCR4, CD20 + CCR7, CD20 + CXCR5, CD20 + RANKL, erbB2 + AXL, erbB1 + cMet, erbB2 + c-Met, erbB2 + EpCAM, c-Met + AXL, c-Met + TF, CD38 + CD20, CD38 + CD138.

64. Гетеродимерное антитело по любому из предшествующих пп.51-56, где указанное биспецифическое антитело имеет специфичность связывания к первому и второму эпитомам, где указанные первый или указанный второй эпитоп расположен на опухолевой клетке и где другой эпитоп расположен на эффекторной, где биспецифическое антитело имеет специфичность связывания с мишенью, выбранной из группы, состоящей из: FcgammaRI (CD64), FcgammaRIII (CD16), CD3, CD89, CD32a, FcεRI.

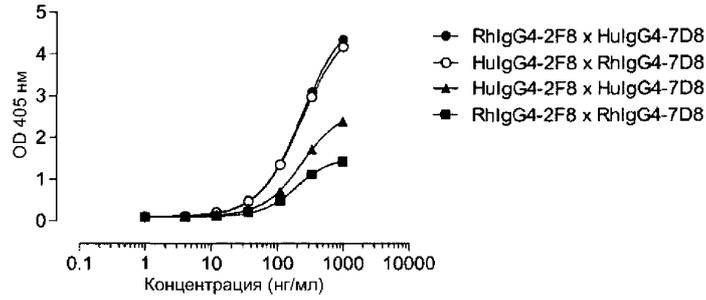
65. Гетеродимерное антитело по любому из предшествующих пп.51-56, где указанное биспецифическое антитело имеет специфичность связывания к первому и второму эпитомам, где указанное биспецифическое антитело имеет специфичность связывания с целевой комбинацией, выбранной из: CD3 + HER2, CD3 + CD20, IL-12 + IL18, IL-1a + IL-1b, VEGF + EGFR, EpCAM + CD3, GD2 + CD3, GD3 + CD3, HER2 + CD64, EGFR + CD64, CD30 + CD16, NG2 + CD28, HER2 + HER3, CD20 + CD28, HER2 + CD16, Bcl2 + CD3, CD19 + CD3, CEA + CD3, EGFR + CD3, IgE + CD3, EphA2 + CD3, CD33 + CD3, MCSP + CD3, PSMA + CD3, TF + CD3, CD19 + CD16, CD19 + CD16a, CD30 + CD16a, CEA + HSG, CD20 + HSG, MUC1 + HSG, CD20 + CD22, HLA-DR + CD79, PDGFR + VEGF, IL17a + IL23, CD32b + CD25, CD20 + CD38, HER2 + AXL, CD89 + HLA class II, CD38 + CD138, TF + cMet, Her2 + EpCAM, HER2 + HER2, EGFR + EGFR, EGFR + c-Met, c-Met + не связывающее плечо и комбинации рецепторов, связанных с G-белком.

66. Применение гетеродимерного антитела по любому из пп.47-65 в качестве лекарственного средства для лечения заболеваний.

67. Применение по п.66, где лекарственное средство используется при лечении рака.

68. Фармацевтическая композиция, включающая гетеродимерное антитело по любому из пп.47-65 и фармацевтически приемлемый носитель.

69. Способ ингибирования роста, и/или пролиферации, и/или уничтожения опухолевых клеток, включающий введение индивидууму, нуждающемуся в этом, гетеродимерного антитела по любому из пп.47-65.

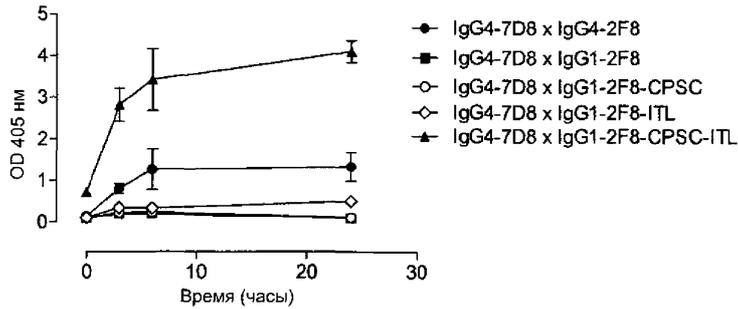


Фиг. 1

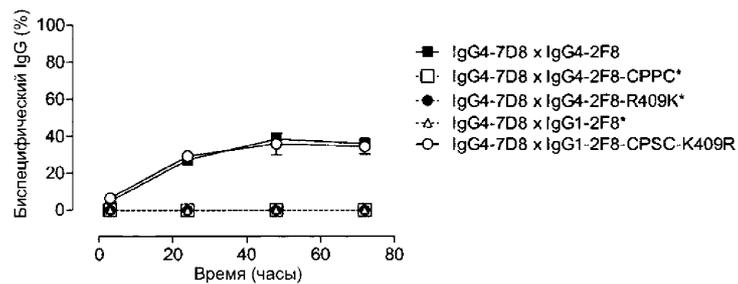
Вид (обычное название)	Изотип	Позиция аминокислоты*																				
		Кор шарнира				Поверхность раздела СН3-СН3																
		226	227	228	229	347	349	350	351	366	368	370	392	394	395	397	398	399	405	409		
<i>Homo sapiens</i>	IgG1	C	P	P	C	P	Q	Y	T	L	T	L	K	K	T	P	V	L	D	F	Y	K
	IgG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-
	IgG3	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	M	-	-	-	-	-	-
	IgG4	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R
<i>Macaca mulatta</i> (макака резус)	IgG1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IgG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IgG3	-	-	-	-	-	-	I	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IgG4 (In)**	-	-	-	-	-	-	I	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-
IgG4 (Ch)**	-	-	A	-	-	-	I	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	

* Нумерация EU; ** In – индийский; **Ch – китайский

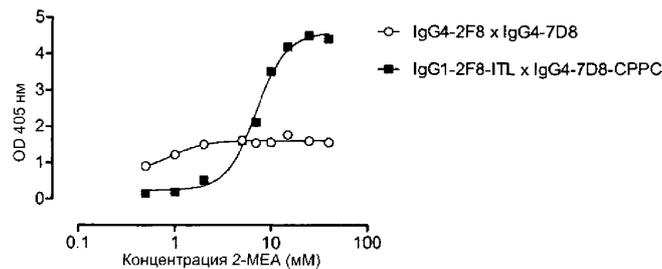
Фиг. 2



Фиг. 3

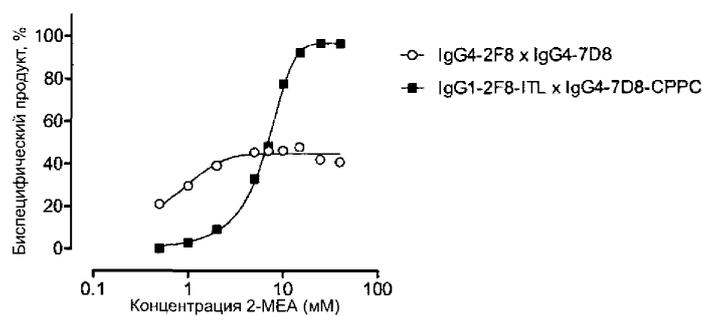
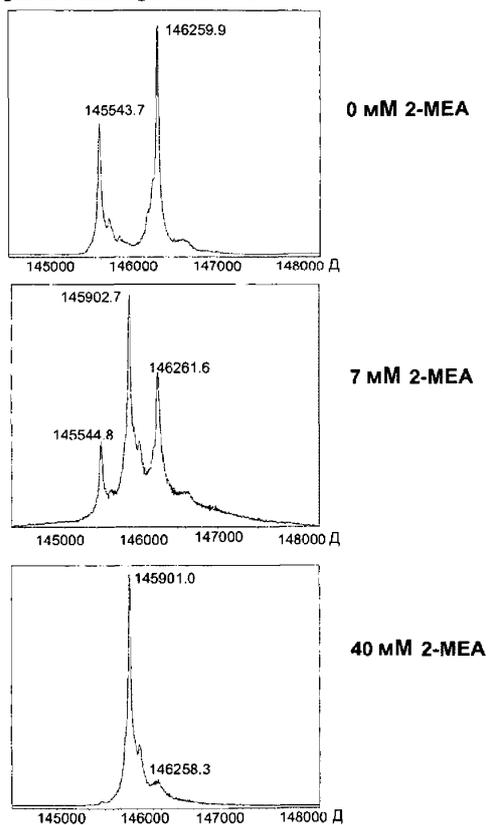


Фиг. 4

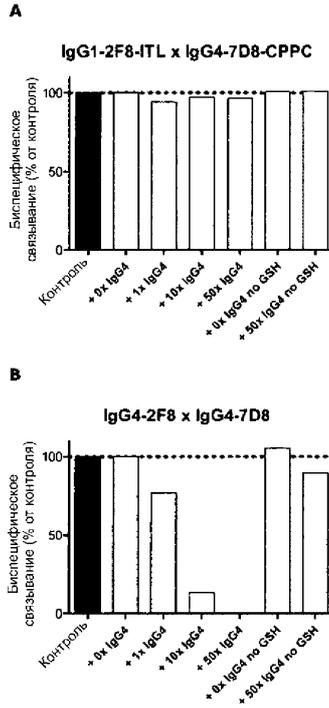


Фиг. 5

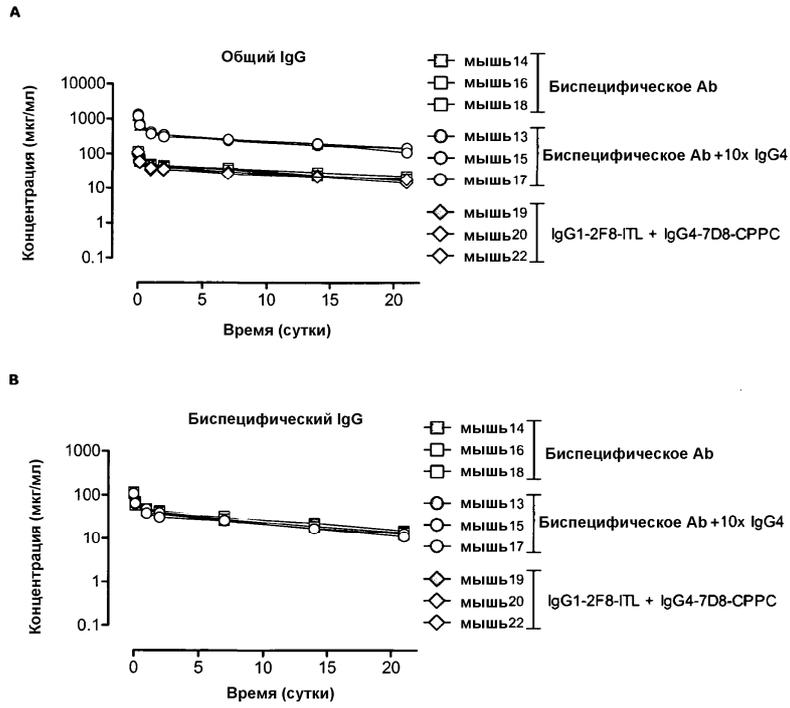
IgG1-2F8-ITL X IgG4-7D8-CPPC



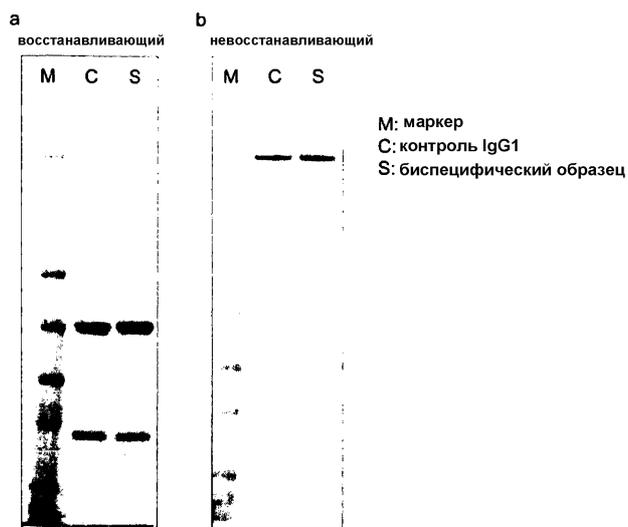
Фиг. 6



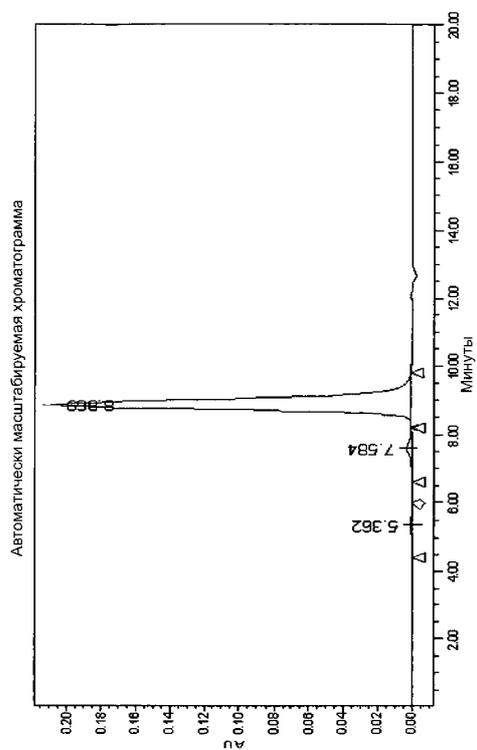
Фиг. 7



Фиг. 8



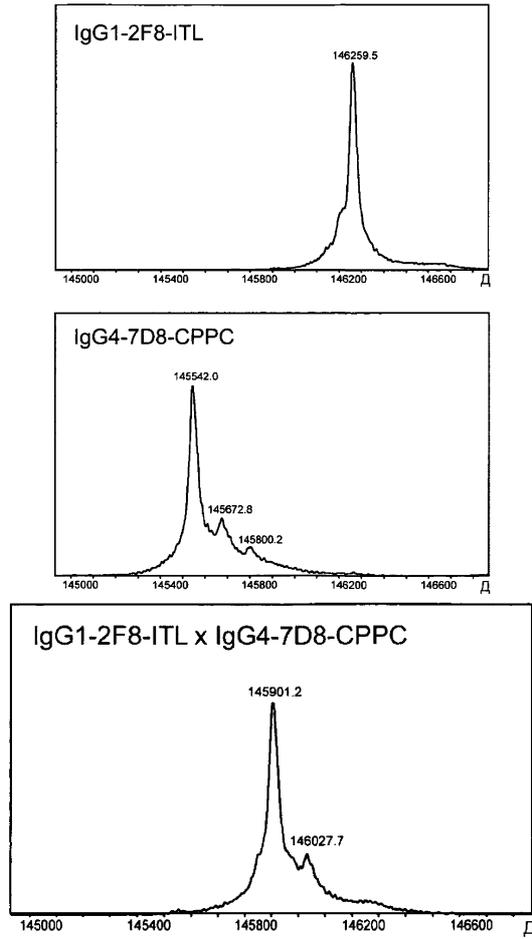
Фиг. 9А



Результаты для пика

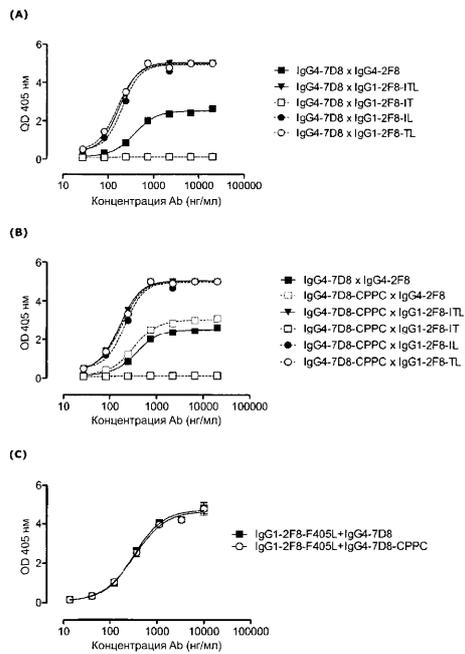
	RT (мин)	Площадь	Высота	Высота, %
1	5.362	18309	448	0.21
2	7.584	82197	2876	1.36
3	8.869	4431069	207416	98.42

Фиг. 9В

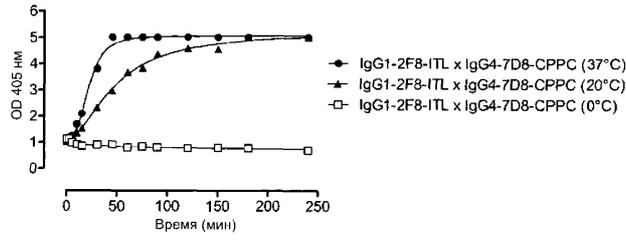


	Измеренная	Измеренная	Измеренная
IgG1-2F8-ITL	146259.5		
IgG4-7D8-CPPC	145542.0	145672.8	145800.2
IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-	145901.2	146027.7	

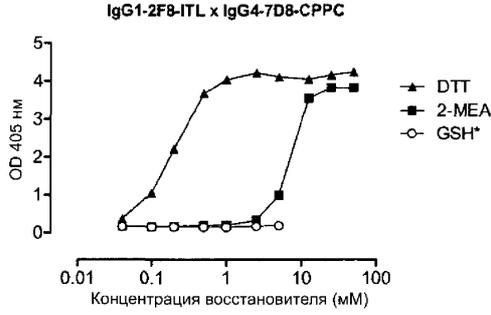
Фиг. 9С



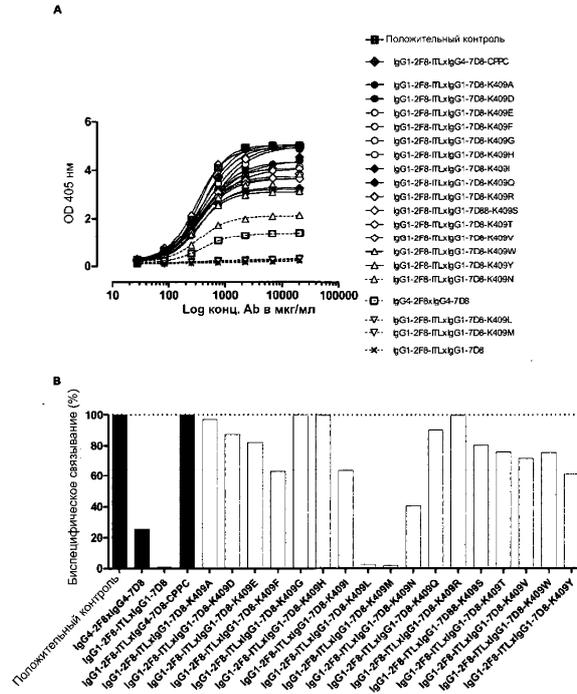
Фиг. 10



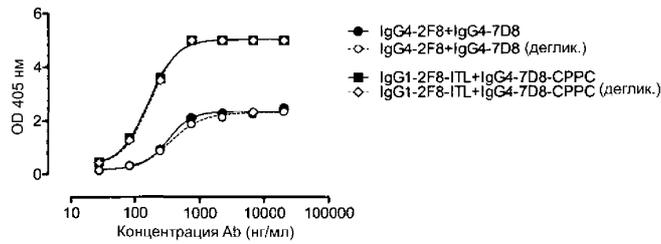
Фиг. 11



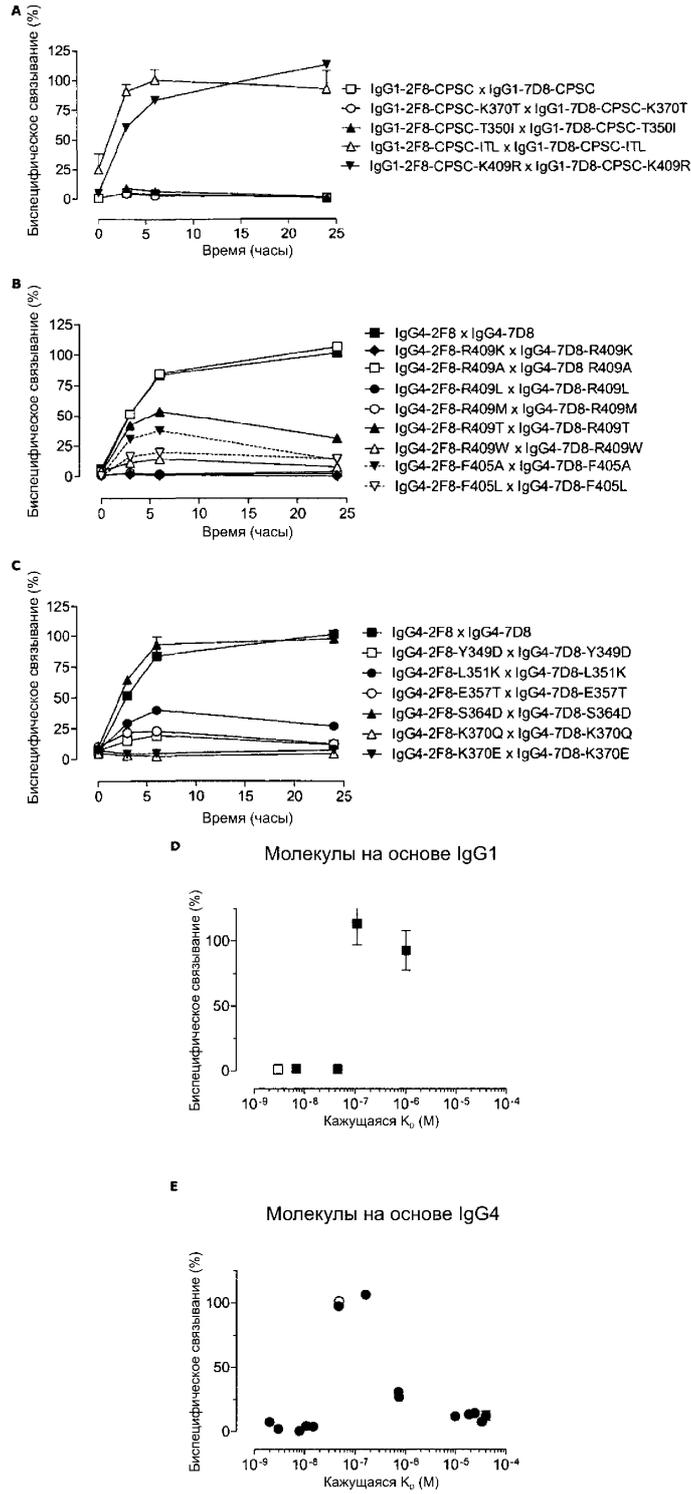
Фиг. 12



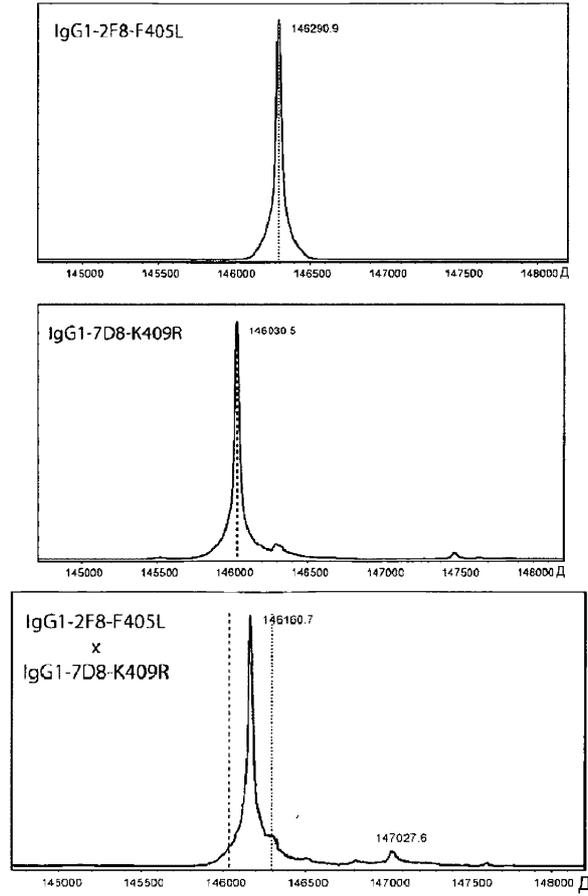
Фиг. 13



Фиг. 14

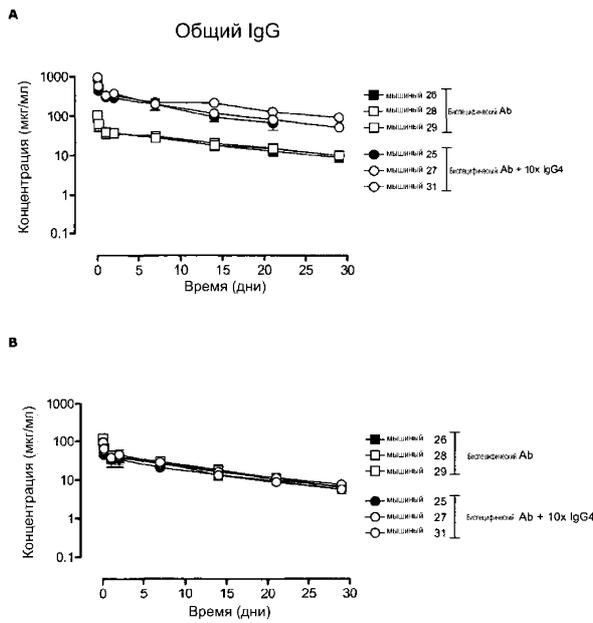


Фиг. 15

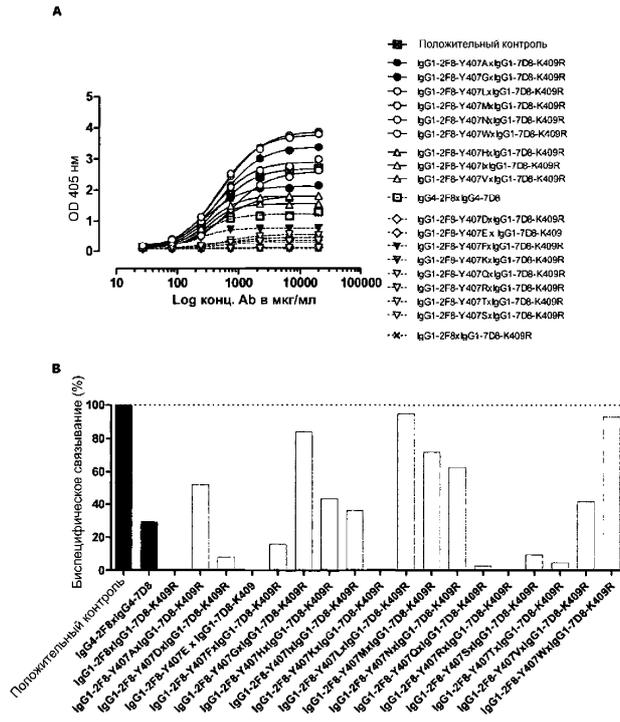


	Измеренная MW
IgG1-2F8-F405L	146,290.9
IgG1-7D8-K409R	146,030.5
IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R	146,160.7

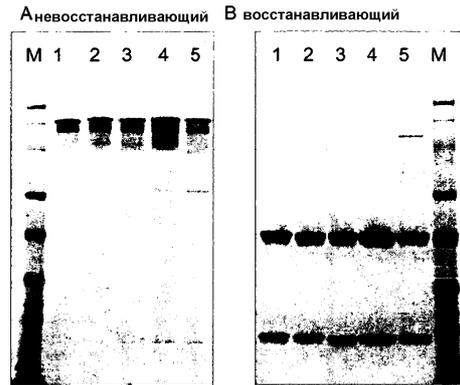
Фиг. 19



Фиг. 20

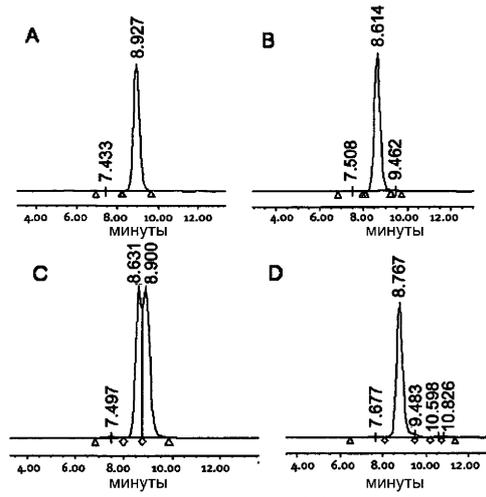


Фиг. 24

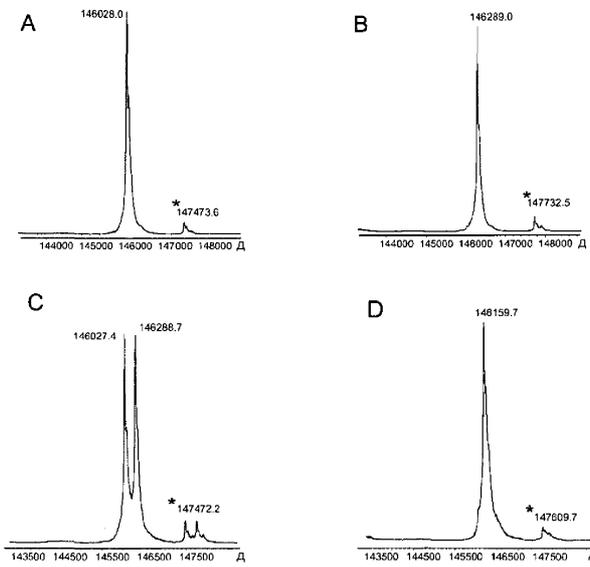


- 1) контроль IgG1 B12
- 2) IgG1-7D8-K409R
- 3) IgG1-2F8-F405L
- 4) IgG1-7D8-K409R + IgG1-2F8-F405L (1:1)
- 5) IgG1-7D8-K409R x IgG1-2F8-F405L (обменявшиеся)

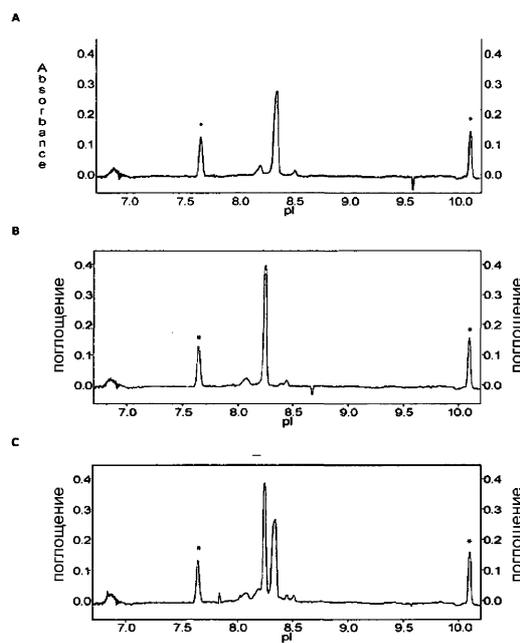
Фиг. 25



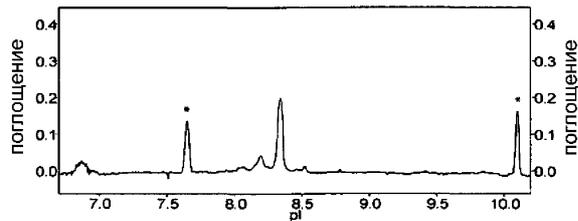
Фиг. 26



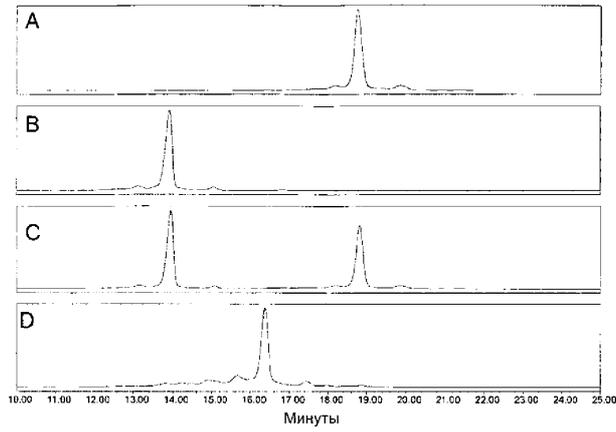
Фиг. 27



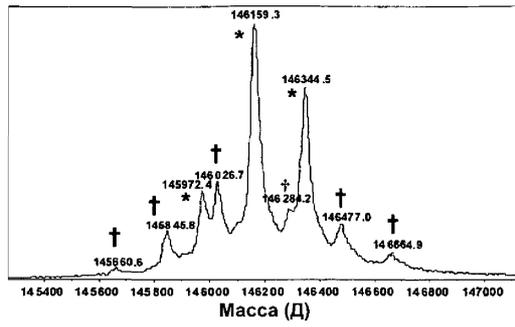
D



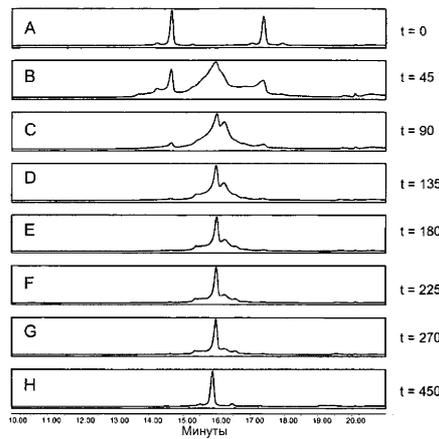
Фиг. 28



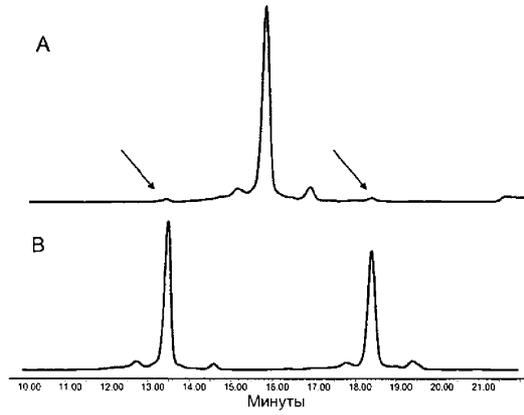
Фиг. 29



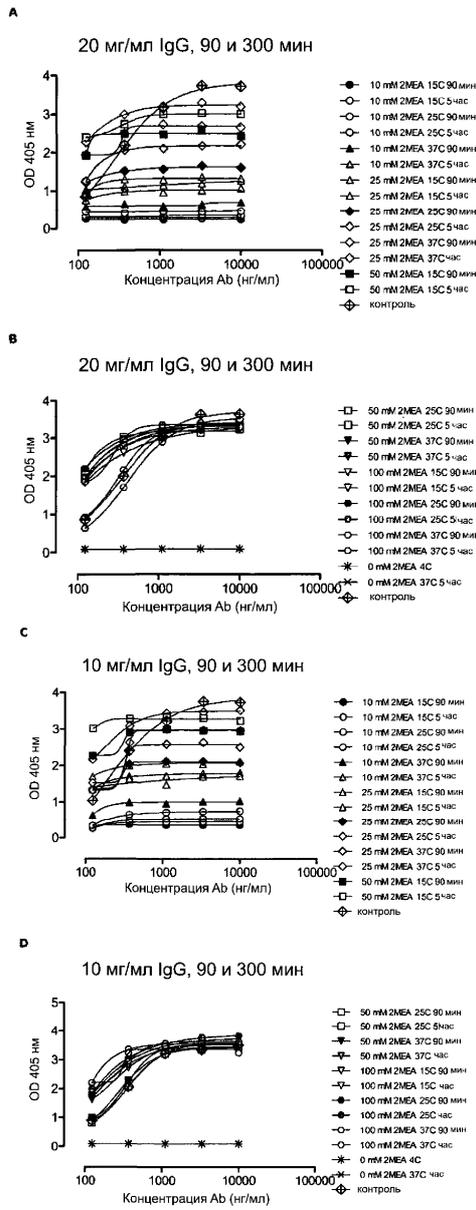
Фиг. 30

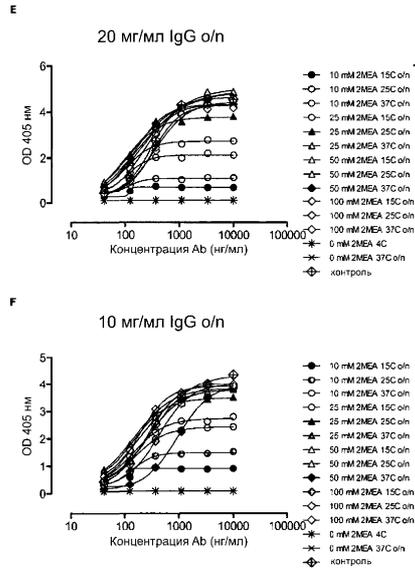


Фиг. 31

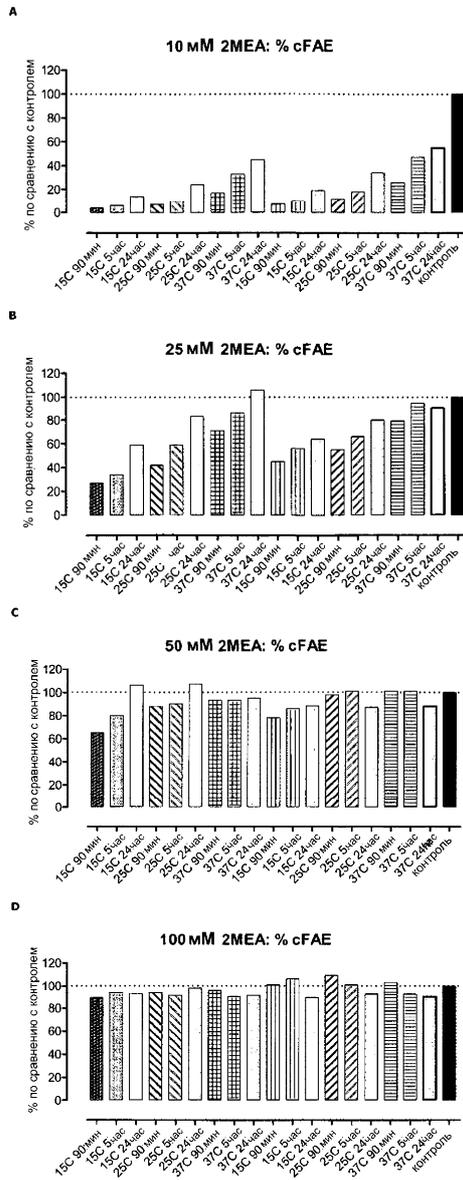


Фиг. 32

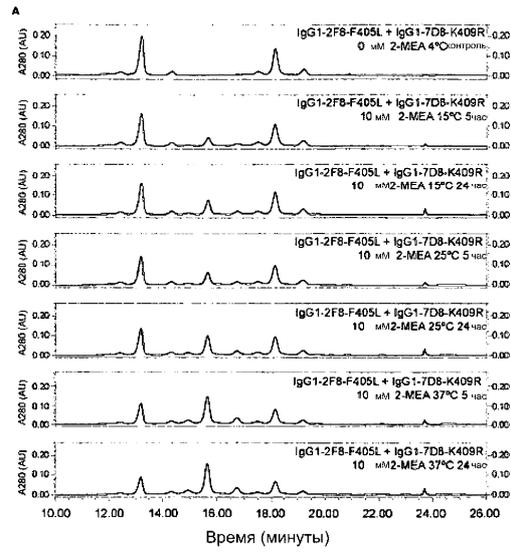




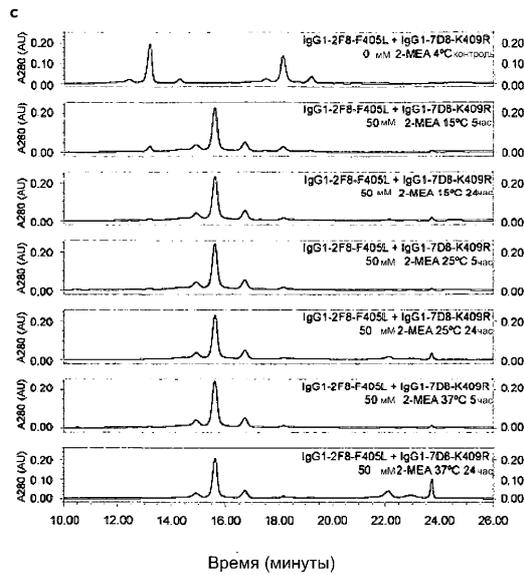
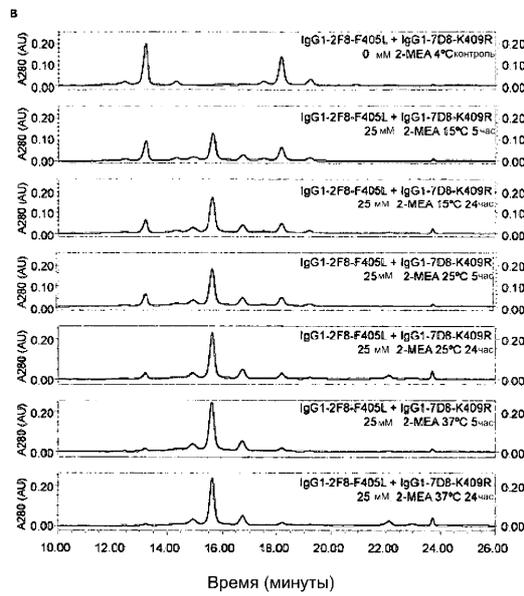
Фиг. 33

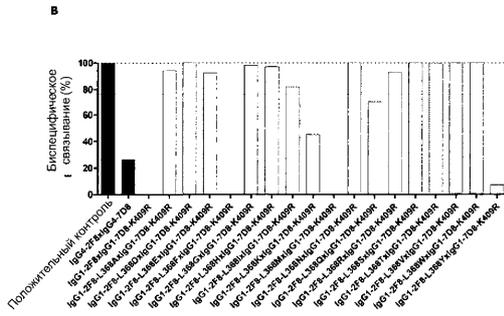
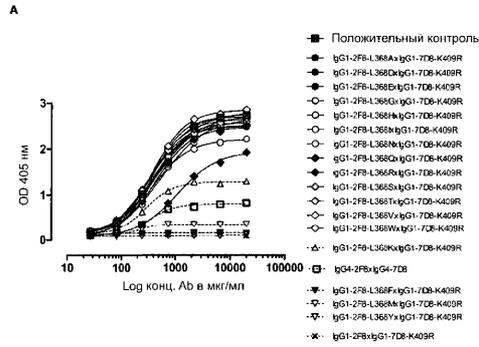
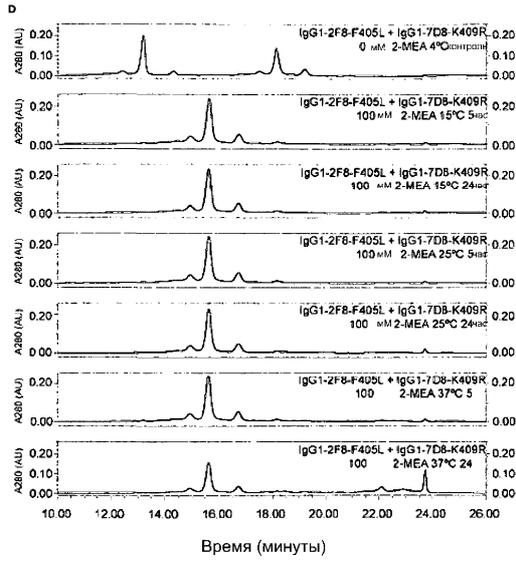


Фиг. 34

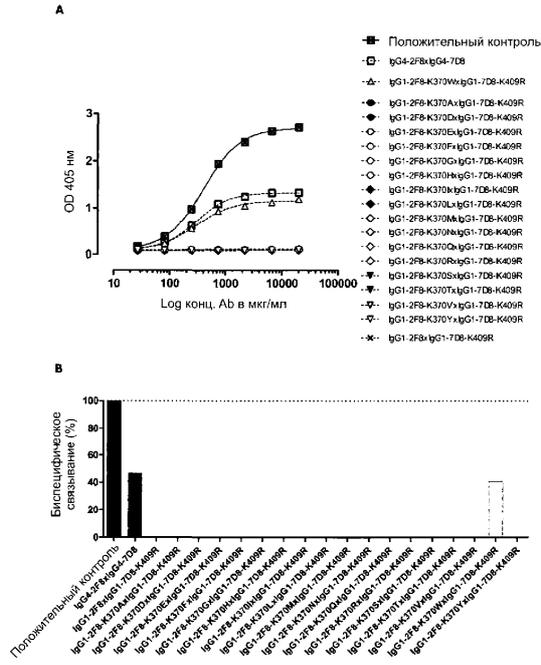


Фиг. 35

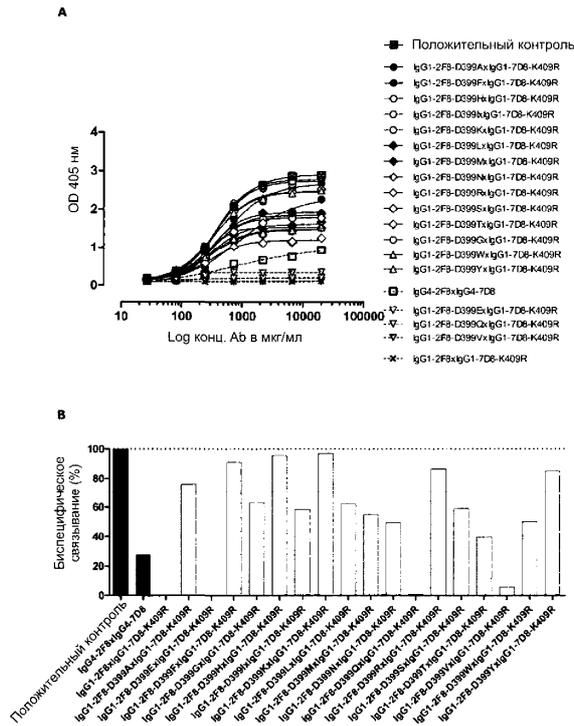




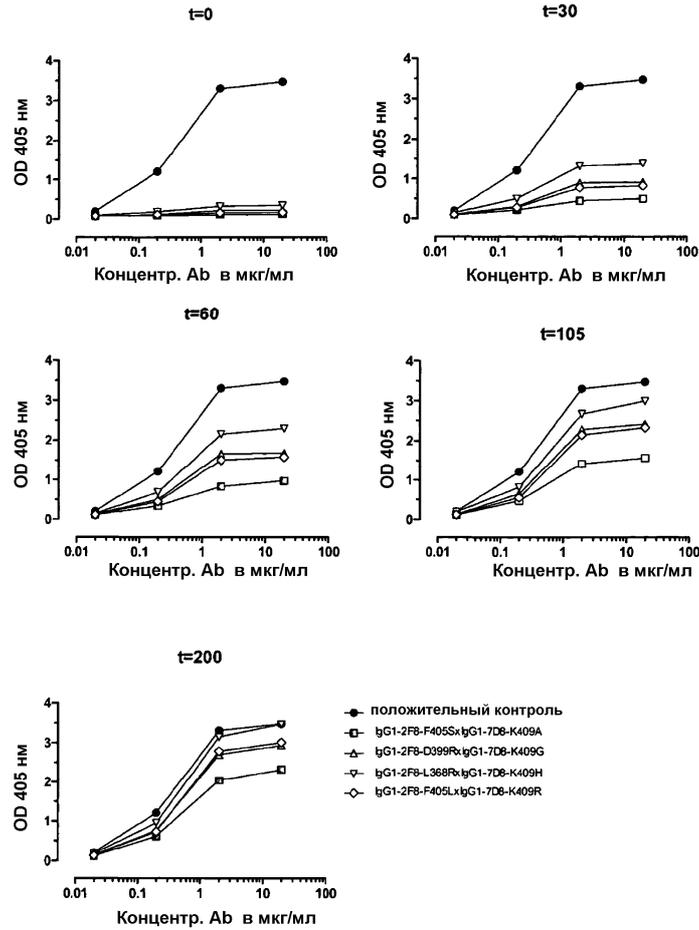
Фиг. 36



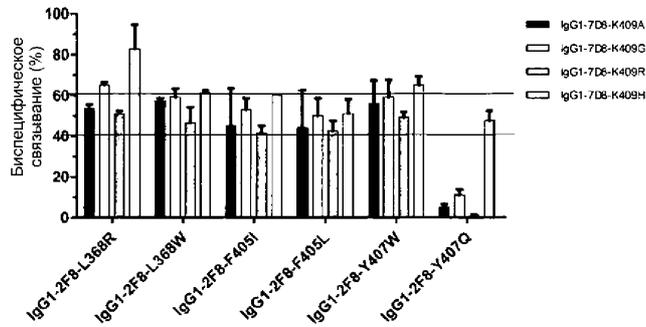
Фиг. 37



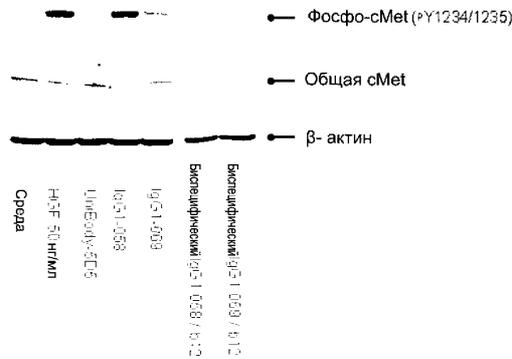
Фиг. 38



Фиг. 39

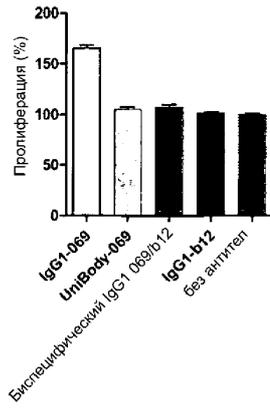


Фиг. 40



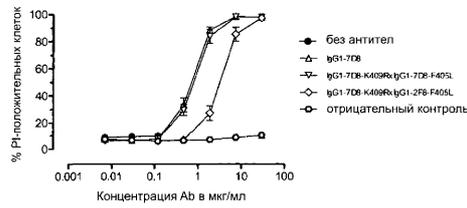
Фиг. 41

Анализ пролиферации NCI-H441, инкубация 7 суток, [mAb] 10 мкг/мл

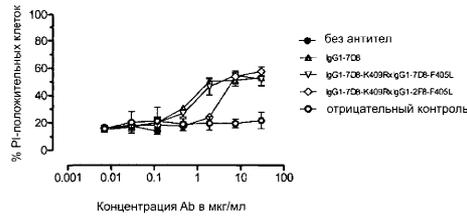


Фиг. 42

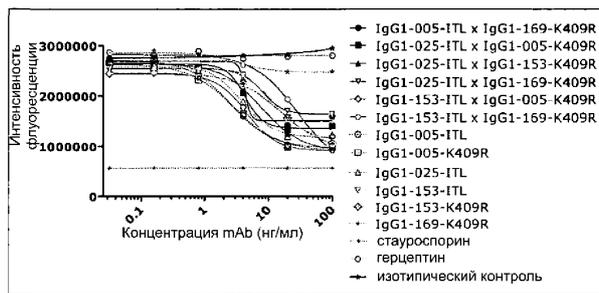
А CDC на клетках Дауди



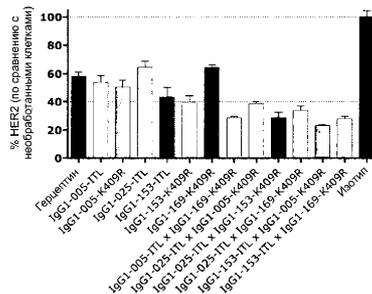
В CDC на клетках Раджи



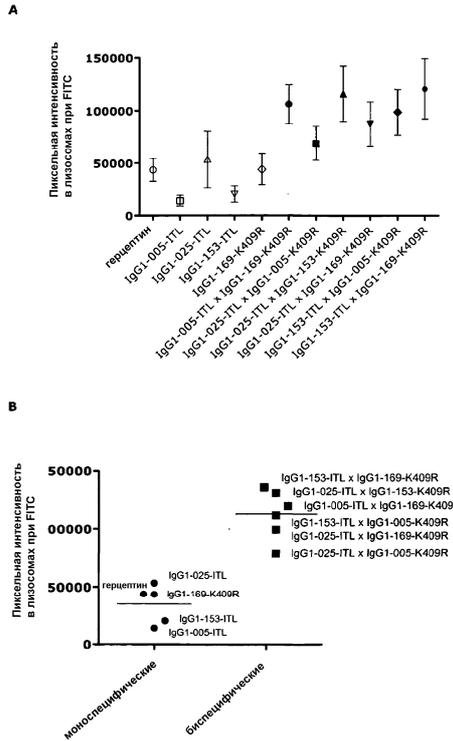
Фиг. 43



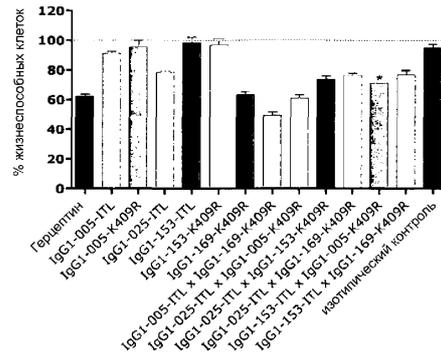
Фиг. 44



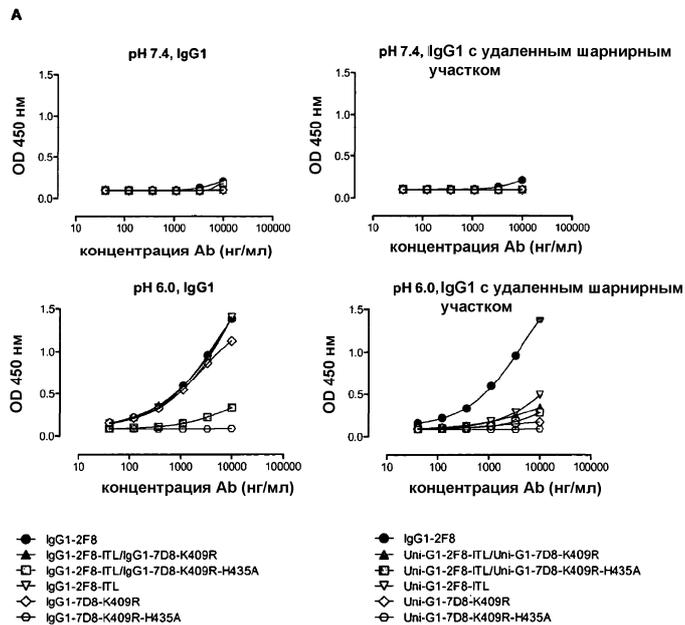
Фиг. 45

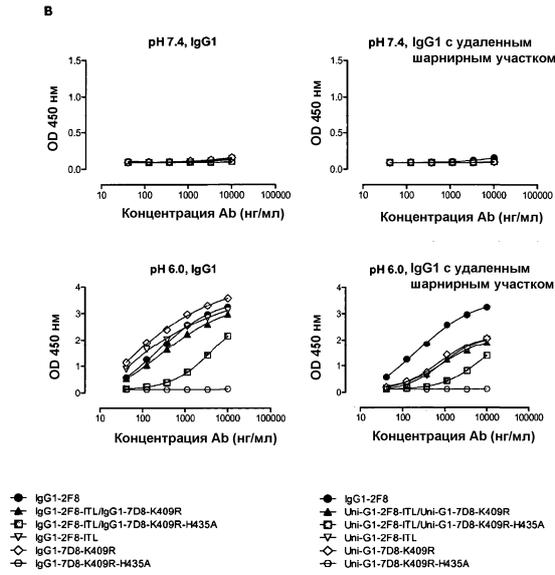


Фиг. 46

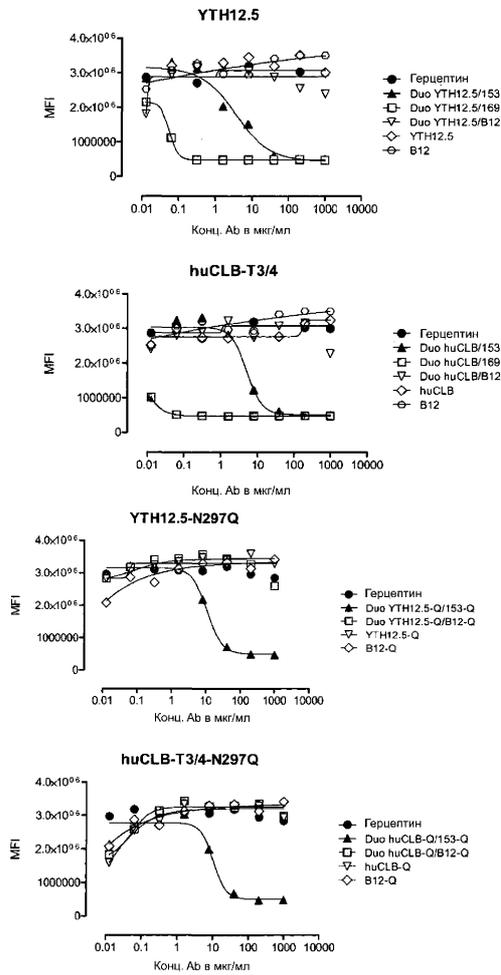


Фиг. 47





Фиг. 48



Фиг. 49