

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392170** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.10.11

(51) Int. Cl. **C07K 16/00** (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 14/74 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.01.27

(54) **БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО**

(31) **202110178932.5; 202110937430.6**

(32) **2021.02.07; 2021.08.16**

(33) **CN**

(86) **PCT/CN2022/074133**

(87) **WO 2022/166728 2022.08.11**

(71) Заявитель:

**ЧИА ТАЙ ТЯНЬЦИН
ФАРМАСЬЮТИКАЛ ГРУП КО.,
ЛТД. (CN)**

(72) Изобретатель:

**Ван Лянлян, Чжан Чжэнпин, Сунь
Цунцун, Чжао Жунцзюань, Ли Имэн
(CN)**

(74) Представитель:

Кузнецова С.А. (RU)

(57) Предусмотрено биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент, где спаренный домен первого антигенсвязывающего фрагмента содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\alpha 3$ HLA-I и аминокислотную последовательность сконструированного $\beta 2M$. Также предусмотрены способ обеспечения экспрессии биспецифического антитела, полинуклеотид, кодирующий биспецифическое антитело, вектор и клетка-хозяин, содержащие полинуклеотид, фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическое антитело, слитый белок и конъюгат. Предусмотренное биспецифическое антитело способно обеспечивать предупреждение или ослабление ошибочных спариваний между тяжелой и легкой цепями с разными специфичностями.

A1

202392170

202392170

A1

P842070694EB

БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛОПервоначальное описание
изобретения**ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ**

Настоящее изобретение относится к антителам и, в частности, к биспецифическому антителу, которое обеспечивает улучшение в отношении ошибочного спаривания легких и тяжелых цепей в антителе.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Nisonoff с коллегами в ранних 1960-х впервые описали концепцию молекулы искусственного антитела с двумя разными антигенсвязывающими участками, биспецифического антитела (BsAb) (Nisonoff et al., *Science*, 132, 1770-1771 (1960)). Они использовали легкое повторное окисление для сочетания кроличьих антигенсвязывающих фрагментов (Fab) с разными специфичностями, демонстрируя, что эти два антигенсвязывающих фрагмента опосредуют агглютинацию двух разных типов клеток (Fudenberg et al., *A. J. Exp. Med.*, 119, 151-166 (1964)). После ряда концептуальных и технологических инноваций, разработанных со значительным прогрессом в инженерии антител и биологии антител, концепция биспецифического антитела была коммерциализирована биотехнологическими и фармацевтическими компаниями с получением новых и уникальных терапевтических способов.

В разработке и моделировании биспецифических антител обязательным является обеспечение правильного спаривания двух пар легких цепей и тяжелых цепей с разными специфичностями в зависимости от клинической терапевтической цели. Также обязательным является поддержание независимости соответствующих связывающих доменов каждого моноклонального антитела, чтобы убедиться, что связывание разных эпитопов не создаст препятствия в виде стерического несоответствия. В то же время также требуется, чтобы молекулы антитела с легкостью экспрессировались клетками млекопитающих без использования сложных процессов модификации белка. Биспецифические антитела в форме асимметричных молекулярных

конструкций стремятся к сохранению природной структуры природных антител настолько, насколько это возможно, с целью сохранить соответствующие функциональные характеристики и подходящие показатели качества. Проблема ошибочного спаривания цепей разрешается путем разрушения симметрии сборки антител H2L2.

Биспецифические антитела стали одной из новых областей изучения лекарственных средств в терапии опухолей благодаря преимуществу, состоящему в двойном нацеливании. Технология конструирования и получения биспецифических антител также претерпела ряд инноваций, и одной из целей является решение проблемы ошибочного спаривания с обеспечением таким образом улучшения эффективности производства. Некоторые биспецифические антитела требуют совместной экспрессии двух разных тяжелых цепей и двух разных легких цепей, и также требуется отбор биспецифических антител, представляющих интерес, из ряда разных рекомбинантных продуктов, что было одной из сложных задач в разработке биспецифических антител. Для решения проблемы ошибочного спаривания цепей в недавние годы ученые разработали множество стратегий и технических платформ, с помощью которых можно моделировать и экспрессировать биспецифические антитела с разными структурами. На сегодняшний день существует множество структур биспецифических антител, которые получают с помощью разных производственных платформ. Наиболее развитыми являются платформы выступ-в-углубление Genentech/Roche, BiTe Amgen и ART-Ig Chugai/Roche, в которых выступ-в-углубление является классической технологией решения проблемы ошибочного спаривания тяжелых цепей, а также существуют другие технические платформы, такие как DVD-Ig, TrioMab, DART, FIT-Ig, WuXiBody и т. п.

В случае большинства биспецифических антител в асимметричной форме достигается гетеродимерная сборка двух разных тяжелых цепей путем введения мутаций в Fc-область (Ridgway et al., *Protein Engineering, Design and Selection*, 9(7), 617-621), что вызывает коррекцию и стимулирует спаривание между тяжелыми цепями. Затем требуемый конечный продукт выделяют посредством стратегии дифференциальной очистки связывающих конструкций с

использованием белка А, объединенных с последующими стратегиями очистки с использованием аффинной хроматографии и дифференциальной хроматографии с разделением по молекулярной массе. Для избегания перспектив ошибочного спаривания легких и тяжелых цепей биспецифические молекулы обычно экспрессируют по отдельности в виде половинных молекул или исходных антител, затем половинные молекулы антител собирают, и гетеродимеры тяжелых цепей можно получать путем конструирования мутаций в тяжелых цепях. Однако селективное спаривание соответствующих легких и тяжелых цепей в отдельных антителах все еще вызывает затруднения.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предусмотрено биспецифическое антитело с улучшенной структурной конструкцией, которая обеспечивает предупреждение или ослабление ошибочного спаривания тяжелой и легкой цепей с разными специфичностями.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрено биспецифическое антитело, содержащее первую антигенсвязывающую часть и вторую антигенсвязывающую часть, которое специфически связывается с двумя разными антигенами или разными эпитопами одного и того же антигена, где первая антигенсвязывающая часть содержит:

первый полипептид, содержащий от N-конца к C-концу: первый вариабельный домен тяжелой цепи и первый спаренный домен, функционально связанный с первым вариабельным доменом тяжелой цепи, и

второй полипептид, содержащий от N-конца к C-концу: первый вариабельный домен легкой цепи и второй спаренный домен, функционально связанный с первым вариабельным доменом легкой цепи,

где один из первого спаренного домена и второго спаренного домена содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\alpha 3$ HLA-I, а другой спаренный домен содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\beta 2$ -микрोगлобулина.

В некоторых вариантах осуществления первый спаренный домен и второй спаренный домен способны образовывать димер, возможно образование по

меньшей мере одной неприродной межцепочечной связи между первым спаренным доменом и вторым спаренным доменом, и при этом неприродная межцепочечная связь способна стабилизировать димер.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность сконструированного $\alpha 3$ HLA-I характеризуется по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 1, и аминокислотная последовательность сконструированного $\beta 2$ -микροглобулина характеризуется по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 2.

В некоторых конкретных вариантах осуществления сконструированный $\alpha 3$ HLA-I содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3, и сконструированный $\beta 2$ -микροглобулин содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4.

В некоторых конкретных вариантах осуществления сконструированный $\alpha 3$ HLA-I содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3, и сконструированный $\beta 2$ -микροглобулин содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления вторая антигенсвязывающая часть содержит второй переменный домен тяжелой цепи и второй переменный домен легкой цепи.

В некоторых вариантах осуществления вторая антигенсвязывающая часть содержит Fab, содержащий второй переменный домен тяжелой цепи и второй переменный домен легкой цепи.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрено биспецифическое антитело, содержащее первую антигенсвязывающую часть и вторую антигенсвязывающую часть, которое специфически связывается с двумя разными антигенами или разными эпитопами одного и того же антигена, где первая антигенсвязывающая часть содержит:

первый полипептид, содержащий от N-конца к C-концу: первый вариабельный домен тяжелой цепи и первый спаренный домен, функционально связанный с первым вариабельным доменом тяжелой цепи, и

второй полипептид, содержащий от N-конца к C-концу: первый вариабельный домен легкой цепи и второй спаренный домен, функционально связанный с первым вариабельным доменом легкой цепи,

где один из первого спаренного домена и второго спаренного домена содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\alpha 3$ HLA-I, а другой спаренный домен содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\beta 2$ -микροглобулина, при этом аминокислотные последовательности сконструированного $\alpha 3$ HLA-I и сконструированного $\beta 2$ -микροглобулина характеризуются по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с последовательностями, представленными под SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 соответственно, при этом вторая антигенсвязывающая часть содержит Fab. В некоторых таких вариантах осуществления аминокислота в CL-доме Fab заменена на аланин в положении F118 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления сконструированный $\alpha 3$ HLA-I содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3, и сконструированный $\beta 2$ -микροглобулин содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрено биспецифическое антитело, содержащее первую антигенсвязывающую часть и вторую антигенсвязывающую часть, которое специфически связывается с двумя разными антигенами или разными эпитопами одного и того же антигена, где первая антигенсвязывающая часть содержит:

первый полипептид, содержащий от N-конца к C-концу: первый вариабельный домен тяжелой цепи и первый спаренный домен, функционально связанный с первым вариабельным доменом тяжелой цепи, и

второй полипептид, содержащий от N-конца к C-концу: первый вариабельный домен легкой цепи и второй спаренный домен, функционально связанный с первым вариабельным доменом легкой цепи,

где один из первого спаренного домена и второго спаренного домена содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\alpha 3$ HLA-I, а другой спаренный домен содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\beta 2$ -микροглобулина, при этом вторая антигенсвязывающая часть содержит Fab, и аминокислота в CL-домене Fab заменена на аланин в положении F118 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых таких вариантах осуществления аминокислотные последовательности сконструированного $\alpha 3$ HLA-I и сконструированного $\beta 2$ -микροглобулина характеризуются по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с последовательностями, представленными под SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 соответственно. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления сконструированный $\alpha 3$ HLA-I содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3, и сконструированный $\beta 2$ -микροглобулин содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления, представленных выше, первый спаренный домен содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\alpha 3$ HLA-I, и второй спаренный домен содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\beta 2$ -микροглобулина.

В некоторых вариантах осуществления, представленных выше, первый спаренный домен содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\beta 2$ -микροглобулина, и второй спаренный домен содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\alpha 3$ HLA-I.

В некоторых вариантах осуществления, представленных выше, биспецифическое антитело содержит Fc.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен выделенный полинуклеотид, кодирующий биспецифическое антитело, описанное в данном документе.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен выделенный вектор, содержащий полинуклеотид, описанный в данном документе.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена клетка-хозяин, содержащая выделенный полинуклеотид или выделенный вектор, описанный в данном документе.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ обеспечения экспрессии биспецифического антитела, включающий культивирование клетки-хозяина в таких условиях, в которых экспрессируется биспецифическое антитело.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическое антитело, описанное в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен конъюгат, содержащий биспецифическое антитело, описанное в данном документе, и терапевтическое средство, связанное или конъюгированное с биспецифическим антителом.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены слитый белок, содержащий слитый компонент, экспрессированный посредством слияния, и биспецифическое антитело.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества биспецифического антитела, фармацевтической композиции, конъюгата или слитого белка, описанного в данном документе.

В биспецифическом антителе по настоящему изобретению спаренные домены в первой антигенсвязывающей части способны обеспечивать улучшение в отношении ошибочного спаривания цепей с применением сконструированного $\alpha 3$ HLA-I и сконструированного $\beta 2$ -микроглобулина. Например, первая антигенсвязывающая часть и вторая антигенсвязывающая часть с меньшей вероятностью окажутся ошибочно спаренными по сравнению со случаем, где как первая, так и вторая антигенсвязывающие части являются эквивалентами природного Fab, с обеспечением таким образом улучшения выхода и чистоты

антитела, представляющего интерес.

В частности, биспецифическое антитело конструируют с сохранением хорошей аффинности к антигену и/или термической стабильности. В определенных аспектах биспецифическое антитело конструируют со снижением риска иммуногенности.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1 показана консенсусная последовательность константной области α -цепи молекулы HLA-I-B;

фиг. 2 представляет собой схематическое изображение структуры биспецифических антител к CD3/CD38, сконструированных на основе элементов MHC-I;

фиг. 3 представляет собой схематическое изображение структуры молекулы MHI383-ccff-IgG1;

фиг. 4 представляет собой график очистки молекулы MHI383-ccff-IgG1 посредством SEC;

фиг. 5 представляет собой полный график масс-спектрометрии с определением молекулярной массы MHI383-ccff-IgG1;

на фиг. 6 показаны результаты SDS-PAGE в невозстанавливающих условиях, где тяжелые и легкие цепи, содержащие MHC1 α -, MHC1 β -, CH1- и CL-домены, спарены друг с другом для экспрессии;

на фиг. 7 показаны результаты SDS-PAGE в невозстанавливающих условиях HZ5G11VL-IgK или продуктов экспрессии, объединенных с HZ14A9VH-C α -IgG1, после введения аминокислотных мутаций;

фиг. 8 представляет собой схематическое изображение структуры биспецифического антитела MHL147-3322-IgG1-wt, сконструированного на основе элементов MHC-I;

фиг. 9 представляет собой схематическое изображение структуры

биспецифического антитела MHL147-3322-IgG1-F118A, сконструированного на основе элементов MHC-I;

на фиг. 10 показано влияние разных концентраций биспецифических антител MHL147-3322-IgG1-wt и MHL147-3322-IgG1-F118A на агглютинацию эритроцитов;

на фиг. 11 показаны результаты SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях антител HZ5G11 и HZ14A9 после введения F118A в CL, и

фиг. 12 представляет собой диаграмму с некоторыми иллюстративными структурными формами биспецифических антител по настоящему изобретению, где (A) представляет собой форму «1 + 1», в которой MHC-модифицированная антигенсвязывающая часть с разными специфичностями (первая антигенсвязывающая часть) и Fab связаны с N-концом Fc-полипептида соответственно; (B) представляет собой форму «1 + 1», в которой MHC-модифицированная антигенсвязывающая часть с разными специфичностями (первая антигенсвязывающая часть с C α и C β в отличных от (A) ориентациях) и Fab связаны с Fc-полипептидом соответственно; (C) представляет собой форму «2 + 1», в которой первая антигенсвязывающая часть и один Fab связаны с Fc-полипептидом соответственно, а другой Fab связан с N-концом первой антигенсвязывающей части; (D) представляет собой форму «2 + 1», отличную от (C), в которой два Fab связаны последовательно; (E) представляет собой форму «2 + 1», в которой два Fab связаны с Fc-полипептидом соответственно, а первая антигенсвязывающая часть связана с N-концом одного Fab; (F) представляет собой форму «2 + 1», отличную от (E), в которой первая антигенсвязывающая часть связана с C-концом Fc-полипептида; (G) представляет собой форму «2 + 2», в которой антигенсвязывающие части связаны с N-концом Fc; (H) представляет собой форму «2 + 2», в которой обе первые антигенсвязывающие части связаны с C-концом Fc; Fc-домен также может содержать аминокислотные замены, как, например, K1H, и CL может содержать F118A, при этом аминокислотные замены не показаны в данных условных обозначениях.

Терминология

Термин «антитело» используется в данном документе в его наиболее широком смысле для обозначения белка, содержащего антигенсвязывающий участок, и охватывает природные и искусственные антитела различных структур, включая без ограничения моноклональные антитела, моноспецифические антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела, триспецифические антитела и т. п.), одноцепочечные антитела и т. п.

Термин «полиспецифический» означает, что антитело способно специфически связываться с по меньшей мере двумя разными антигенными детерминантами. Как правило, биспецифическое антитело содержит два антигенсвязывающих участка, каждый из которых является специфическим в отношении другой антигенной детерминанты. Разные антигенные детерминанты могут экспрессироваться на одной или разных клетках. Разные антигенные детерминанты могут быть разными в зависимости от разных типов антигенов (например, связывание с антигенами PDL1 и CD47) или могут присутствовать в одном и том же антигене. Антигенная детерминанта является особой химической группой с определенным составом и структурой на поверхности или других частях молекулы антигенного вещества, которая способна специфически связываться с соответствующим ему антителом или сенсibilизированным лимфоцитом. Примером антигенной детерминанты является антигенная детерминанта CD47, которая является антигенным веществом с различными структурно определенными или структурно неопределенными антигенными детерминантами. Специфическое биспецифическое антитело может связываться, например, с PDL1 и CD47.

Термин «специфически связывается с» означает, что связывание является селективным в отношении антигена, и его можно отличить от взаимодействий, которые не требуются или являются неспецифическими.

Термин «...валентное» антитело относится к количеству антигенсвязывающих участков, присутствующих в антителе. «Бивалентное» антитело относится к присутствию двух антигенсвязывающих участков в антителе, а «тривалентное» относится к присутствию трех антигенсвязывающих участков в антителе. Природная молекула иммуноглобулина человека, как правило, содержит два

антигенсвязывающих участка, а Fab, как правило, содержит один антигенсвязывающий участок. Одиночный переменный домен и ScFv, как правило, содержат один антигенсвязывающий участок.

Термин «антигенсвязывающая часть» относится к молекуле полипептида, специфически связывающейся с антигенной детерминантой. Специфические антигенсвязывающие части могут представлять собой Fab, ScFv, одиночный переменный домен или т. п. В данном документе антигенная детерминанта является синонимом эпитопа антигена.

Термин «первый», «второй» или «третий», используемый в данном документе по отношению к антигенсвязывающей части, антигену, переменному домену тяжелой цепи, переменному домену легкой цепи, Fc-полипептиду и т. п., используется для облегчения разграничения в случае, когда присутствует более чем одна часть каждого типа. Если конкретно не указано иное, использование этих терминов не предназначено для присвоения конкретного порядка или ориентации биспецифическому антителу.

Термин «функциональная связь» или «функционально связанный» относится к непосредственному соседству двух или более биологических последовательностей, представляющих интерес, такому, что они находятся во взаимосвязи, что позволяет им функционировать предусматриваемым образом, независимо от присутствия или отсутствия спейсера или линкера. Если он используется по отношению к полипептидам, то термин предназначен для указания на то, что полипептидные последовательности связаны таким образом, что продукт связи обладает предусматриваемой биологической функцией. Например, переменная область антитела может быть функционально связана с константной областью с образованием стабильного продукта с антигенсвязывающей активностью. Термин также можно использовать по отношению к полинуклеотидам. Например, если полинуклеотид, кодирующий полипептид, функционально связан с регуляторной последовательностью (например, промоторной, энхансерной или сайленсерной последовательностью), термин предназначен для указания на то, что полинуклеотидная последовательность связана таким образом, что обеспечивается регулируемая экспрессия полипептида с полинуклеотида.

Главный комплекс гистосовместимости (МНС) является общим обозначением группы генов, которые кодируют антигены главного комплекса гистосовместимости у животных. МНС мыши называется комплексом генов H-2. МНС человека называется комплексом генов лейкоцитарных антигенов человека (HLA), и кодируемый им продукт называется HLA-молекулой, HLA-антигеном или лейкоцитарным антигеном человека. Комплекс генов HLA расположен на коротком плече бр21.3 хромосомы 6 человека и содержит более 220 генов с разными функциями. Большинство этих генов кодирует белки иммунной системы. Молекулы МНС I класса экспрессируются на поверхности почти всех клеток с ядром и распознаются CD8+ Т-клетками. Молекулы МНС II класса экспрессируются на поверхности антигенпредставляющих клеток и распознаются CD4+ Т-клетками. МНС является полиморфным, и основная часть популяции главным образом содержит 6 классических молекул МНС: 3 классические молекулы МНС I класса (HLA-A, HLA-B и HLA-C) и 3 классические молекулы МНС II класса (HLA-DR, HLA-DP и HLA-DQ). Молекула МНС I класса человека (HLA-1) состоит из тяжелой цепи (α -цепи) и β_2 -микроглобулина (β_2m или β -цепи), где внеклеточный сегмент α -цепи содержит три домена ($\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$), при этом 2 домена $\alpha 1$ и $\alpha 2$ на дистальном конце от мембраны образуют антигенсвязывающий желобок, а домен $\alpha 3$ является гомологичным константной области иммуноглобулина человека.

Термин «вариабельный домен» или «вариабельная область» относится к домену антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Например, природное четырехцепочечное антитело (например, полученное от человека, мышинное и т. п.) содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), а антитело из тяжелых цепей, полученное от животного, такого как представитель верблюдовых или акула, содержит одиночный вариабельный домен. Каждый вариабельный домен природного антитела по сути состоит из четырех «каркасных областей» и трех «участков, определяющих комплементарность». Четыре каркасные области называются каркасной областью 1 (или FR1), каркасной областью 2 (или FR2), каркасной областью 3 (или FR3) и каркасной областью 4 (или FR4) соответственно. Каркасные области разделены тремя участками, определяющий комплементарность (или CDR), называемыми в уровне техники и далее в

данном документе участком 1, определяющим комплементарность (или CDR1), участком 2, определяющим комплементарность (или CDR2), и участком 3, определяющим комплементарность (или CDR3), соответственно. Таким образом, общая структура переменного домена может быть представлена следующим образом: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Переменные домены придают антителу специфичность в отношении антигена благодаря содержанию антигенсвязывающего участка.

«CDR» (участок, определяющий комплементарность) также называют «гипервариабельной областью (HVR)». Природное четырехцепочечное антитело, как правило, содержит шесть CDR, три в переменной области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три в переменной области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3). Антитело из тяжелых цепей или одиночный переменный домен как правило содержат три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3).

В настоящее время существует множество способов определения CDR. Схема согласно Kabat позволяет определить CDR на основании изменчивости последовательности и является наиболее широко применяемой (Elvin A. Kabat, et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)), в то время как схема согласно Chothia позволяет определить CDR на основании положения структурных петель (Cyprus Chothia, et al., *Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins*, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917(1987)). Схема AbM, нечто среднее между схемой согласно Kabat и схемой согласно Chothia, используется в программном обеспечении для моделирования антител AbM от Oxford Molecular. «Contact» позволяет определить CDR на основании анализа кристаллической структуры доступных комплексов. Однако следует отметить, что границы CDR переменных областей одного антитела на основании разных способов и определений могут отличаться, то есть могут отличаться последовательности CDR переменных областей одного антитела, определенные разными способами. Таким образом, если отмечено, что антитело определено конкретной последовательностью CDR, определенной в данном документе, то объем понятия антитела также охватывает антитела, определяемые последовательностями CDR, которые преобразованы в другие

произвольные определения (например, определения согласно Chothia, AbM и т. п.).

Термин «каркасная область» или «FR» относится к аминокислотным остаткам переменных доменов, отличным от остатков CDR, определенных в данном документе.

Термин «Fab» относится к белку, состоящему из VH- и CH1-доменов тяжелой цепи и VL- и CL-доменов легкой цепи иммуноглобулина. Fab в данном документе относится к Fab в его природной форме или модифицированному Fab, содержащему тяжелую цепь Fab, состоящую из переменной области тяжелой цепи и константной области CH1 (VH-CH1, в направлении от N-конца к C-концу), и легкую цепь Fab, состоящую из переменной области легкой цепи и константной области CL (VL-CL, в направлении от N-конца к C-концу). Модифицированный Fab может представлять собой, например, Fab с введением аминокислотной замены в CH1/CL-домен и/или VH/VL-домен. В качестве конкретного примера модифицированный Fab может представлять собой Fab с введением аминокислотной замены в CL-домен.

Термин «Fc-домен» или «Fc» используется в данном документе для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Термин включает Fc с природной последовательностью и Fc с вариантной последовательностью. C-концевой лизин (Lys447) Fc может присутствовать или может не присутствовать. Если не указано иное, аминокислотные остатки в Fc нумеруются в соответствии с системой нумерации EU, также называемой EU-индексом, описанной в Kabat, E.A. et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242. Если первый спаренный домен и второй спаренный домен включают описание положений аминокислот, это означает, что они пронумерованы в последовательности в соответствии с начальной аминокислотой соответствующей последовательности в качестве первого положения, например, замена R60C в SEQ ID NO: 1 означает, что R в положении 60 в последовательности, пронумерованной начиная с первой аминокислоты в SEQ ID NO: 1 в качестве положения 1, заменен на C. При использовании в данном

документе один из «Fc-полипептидов» Fc-домена относится к одному из двух полипептидов, которые образуют димерный Fc-домен. Например, Fc-полипептид Fc-домена IgG содержит константные области CH2 IgG и CH3 IgG.

Используемый в данном документе термин «KD» относится к равновесной константе диссоциации, выраженной в молярной концентрации (M). Значение KD антитела может быть определено с применением способов, широко известных из уровня техники. Способом определения KD антитела является применение поверхностного плазмонного резонанса, например, применение биосенсорной системы, такой как система Biacore. Способом определения KD антитела является применение биослойной интерферометрии (BLI), например, системы ForteBio.

Термин «осуществление лечения» или «лечение» относится к попытке изменить природное течение заболевания у подвергающегося лечению индивидуума и может представлять собой клиническое вмешательство, проводимое для профилактики или в ходе течения клинической патологии. Требуемые терапевтические эффекты включают без ограничения предупреждение возникновения или повторного возникновения заболеваний, ослабление симптомов, снижение любых прямых или опосредованных патологических исходов заболеваний, предупреждение метастазирования, замедление скорости прогрессирования заболевания, улучшение или облегчение болезненных состояний и обеспечение регресса или улучшение прогноза.

Термин «субъект» включает любое животное, являющееся человеком или являющееся отличным от человека. Термин «отличное от человека животное» включает всех позвоночных, например млекопитающих и не млекопитающих, таких как отличные от человека приматы, овца, собака, кошка, лошадь, корова, курица, земноводные и пресмыкающиеся. Предпочтительно субъект в соответствии с настоящим изобретением является человеком. Термины «пациент» и «субъект» используются взаимозаменяемо, если не указано иное.

Термин «выделенный» означает, что соединение, представляющее интерес (например, VHH, полиспецифическое антитело, антитело или нуклеиновая

кислота), было выделено из его природного окружения.

«Процент идентичности (%)» аминокислотной последовательности относится к проценту аминокислотных остатков в последовательности, подлежащей выравниванию, которые идентичны таковым конкретной аминокислотной последовательности, представленной в данном документе, когда последовательность, подлежащую выравниванию, выравнивают с конкретной аминокислотной последовательностью, представленной в данном документе, при необходимости с внесением гэпов с достижением максимального процента идентичности последовательностей и без рассмотрения любых консервативных замен в качестве части идентичности последовательностей. Выравнивание аминокислотных последовательностей для определения идентичности можно проводить множеством способов, находящихся в пределах специализации в данной области техники, таких как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалист в данной области техники может определить подходящие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые требуемые алгоритмы, для получения максимального выравнивания для полной длины сравниваемых последовательностей.

В контексте настоящего изобретения аминокислотные замены представлены в следующем виде: исходная аминокислота-положение-замененная аминокислота, с применением трехбуквенных или однобуквенных кодов, включая коды Хаа и X для представления аминокислотных остатков. Таким образом, например, «H435R» означает, что аминокислота H в положении 435 заменена на аминокислоту R, и может содержать более чем 1 замененная аминокислота, например, T366Y/W означает, что аминокислота T в положении 366 заменена на аминокислоту Y или W.

Термин «включает», «содержит» или «предусматривает» и их варианты следует понимать как «включающий без ограничения», что означает, что охватываются другие элементы, компоненты и стадии, которые не указаны, в дополнение к элементам, компонентам и стадиям, которые перечислены.

Если иное явно не определено в данном документе, термины в единственном числе охватывают термины во множественном числе и наоборот.

Все патенты, заявки на патенты и другие указанные публикации явным образом включены в данный документ посредством ссылки с целью описания. Эти публикации представлены только по причине того, что они были раскрыты до даты подачи настоящей заявки. Все утверждения относительно дат этих документов или описания содержания этих документов основаны на информации, доступной заявителю, и не являются каким-либо признанием правильности дат или содержания этих документов. Кроме того, в любой стране или регионе любая ссылка на эти публикации в данном документе не должна пониматься как признание того, что публикации являются частью общеизвестных знаний в данной области техники. Различные аспекты настоящего изобретения будут описаны более подробно в следующих разделах.

Различные аспекты настоящего изобретения будут описаны более подробно в следующих разделах.

Биспецифическое антитело

В соответствии с настоящим изобретением константная область одной антигенсвязывающей части является сконструированной, и полученное путем конструирования биспецифическое антитело способно обеспечивать предупреждение или ослабление ошибочного спаривания тяжелых и легких цепей с разными специфичностями с обеспечением таким образом улучшения выхода и/или чистоты антитела, представляющего интерес. В частности, $\alpha 3$ -домен и $\beta 2$ -микроглобулин молекулы МНС-I человека получены путем конструирования, и первый спаренный домен и второй спаренный домен сконструированы с заменой СН1- и СL-доменов антитела так, чтобы обеспечивать улучшение в отношении ошибочного спаривания цепей. Например, первая антигенсвязывающая часть и вторая антигенсвязывающая часть с меньшей вероятностью окажутся ошибочно спаренными по сравнению со случаем, где как первая, так и вторая антигенсвязывающие части являются эквивалентами природного Fab.

Иммуногенность существующих биологических лекарственных средств главным образом подразделяется на эндогенную и экзогенную. Эндогенная иммуногенность обусловлена аминокислотными последовательностями, отличными от последовательностей человека, структурными формами,

отличными от структурных форм человека, и рядом химических модификаций (точечных мутаций, вариантов слитых доменов, преобразований гликоформ и т. п.). Экзогенная иммуногенность главным образом обусловлена способом производства, доставкой лекарственного средства, генетическим фоном пациентов, дозировкой, частотой и способом введения и т. п. С увеличивающимся разнообразием и количеством биологических лекарственных средств и их широким применением также постепенно начинают привлекать значительное внимание проблемы, связанные с иммуногенностью. Главный комплекс гистосовместимости (МНС) является основным элементом для распознавания иммунной системой и участвует в адаптивном иммунном процессе организма. Биспецифические антитела, разработанные на основе композиций на основе молекул МНС, характеризуются хорошей совместимостью с иммунным окружением организма человека. По сравнению с молекулами МНС II класса молекулы МНС I класса более широко распространены, экспрессируются на поверхности почти всех клеток с ядром и распознаются CD8⁺ Т-клетками. Среди молекул HLA-I количество молекул МНС-I человека класса HLA-I-B является наибольшим, и поэтому для конструирования структурных элементов биспецифических антител выбирают и используют константные области молекул МНС-I человека на основе класса HLA-I-B, что может снизить риск иммуногенности.

Кроме того, константные области молекул МНС-I человека на основе класса HLA-I-B не содержат сайты N-связанного и O-связанного гликозилирования и поэтому характеризуются хорошими возможностями для разработки и низкой иммуногенностью.

Посредством экспериментов было обнаружено, что сконструированные биспецифические антитела все еще характеризуются хорошей эффективностью в отношении связывания антигена.

В настоящем изобретении предусмотрено биспецифическое антитело, содержащее первую антигенсвязывающую часть и вторую антигенсвязывающую часть, которое специфически связывается с двумя разными антигенами или разными эпитопами одного и того же антигена, где первая антигенсвязывающая часть содержит:

первый полипептид, содержащий от N-конца к C-концу: первый вариабельный домен тяжелой цепи и первый спаренный домен, функционально связанный с первым вариабельным доменом тяжелой цепи, и второй полипептид, содержащий от N-конца к C-концу: первый вариабельный домен легкой цепи и второй спаренный домен, функционально связанный с первым вариабельным доменом легкой цепи, где один из первого спаренного домена и второго спаренного домена содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\alpha 3$ HLA-I, а другой спаренный домен содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\beta 2$ -микроглобулина.

В некоторых вариантах осуществления первый спаренный домен и второй спаренный домен способны образовывать димер, возможно образование по меньшей мере одной неприродной межцепочечной связи между первым спаренным доменом и вторым спаренным доменом, и при этом неприродная межцепочечная связь способна стабилизировать димер.

Первый спаренный домен и второй спаренный домен способны образовывать димер, который характеризуется хорошей аффинностью связывания с антигеном в разных ориентациях расположения первой антигенсвязывающей части (например, связана с вариабельной областью легкой цепи или вариабельной областью тяжелой цепи).

В одном варианте осуществления первый спаренный домен содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\alpha 3$ HLA-I, и второй спаренный домен содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\beta 2$ -микроглобулина.

В другом варианте осуществления первый спаренный домен содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\beta 2$ -микроглобулина, и второй спаренный домен содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\alpha 3$ HLA-I.

Неприродная межцепочечная связь может стабилизировать димер, образованный первым спаренным доменом и вторым спаренным доменом, и аминокислотные остатки, образующие неприродную межцепочечную связь,

находятся в зоне контакта первого спаренного домена и второго спаренного домена для эффективного образования связи. Термин «зона контакта» относится к конкретной области в полипептидах, где полипептиды взаимодействуют/ассоциируют друг с другом. Зона контакта содержит один или более аминокислотных остатков, которые способны взаимодействовать с соответствующими аминокислотными остатками в контакте или ассоциации при возникновении взаимодействия. Аминокислотные остатки в зоне контакта могут представлять собой или не представлять собой непрерывную последовательность. Например, если зона является трехмерной, то аминокислотные остатки в пределах зоны могут находиться разрозненно в разных положениях в линейной последовательности.

Количество неестественных межцепочечных связей составляет 1-3, например, может составлять 1, 2 или 3, и предпочтительно количество неестественных межцепочечных связей составляет 1, чтобы сохранялось максимальное сходство с природным антителом. В одном варианте осуществления неестественная межцепочечная связь представляет собой дисульфидную связь.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность сконструированного $\alpha 3$ HLA-I характеризуется по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 1, и аминокислотная последовательность сконструированного $\beta 2$ -микроглобулина характеризуется по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные последовательности сконструированного $\alpha 3$ HLA-I и сконструированного $\beta 2$ -микроглобулина характеризуются по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с последовательностями, представленными под SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 соответственно.

Последовательность, представленная под SEQ ID NO: 1, получена из консенсусной последовательности, полученной путем выравнивания последовательностей константной области множества молекул класса HLA-I-B,

и спаренные домены, образованные путем использования или модифицирования консенсусной последовательности, характеризуются высокой степенью универсальности.

В некоторых вариантах осуществления сконструированный $\alpha 3$ HLA-I содержит аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную замену в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1, и сконструированный $\beta 2$ -микροглобулин содержит аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную замену в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 2.

Аминокислотные замены в сконструированном $\alpha 3$ HLA-I и сконструированном $\beta 2$ -микροглобулине предусматривают аминокислотные замены, которые образуют неприродную межцепочечную связь (например, дисульфидную связь), и/или аминокислотные замены, которые улучшают димер, образованный спаренными доменами, или биспецифическое антитело.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены как в сконструированном $\alpha 3$ HLA-I, так и в сконструированном $\beta 2$ -микροглобулине предусматривают замены на остаток цистеина, которые происходят в зоне контакта между ними двумя и способны образовывать дисульфидную связь друг с другом. В конкретном варианте осуществления замена на остаток цистеина представляет собой R60C в SEQ ID NO: 1 и Y26C в SEQ ID NO: 2. В конкретном варианте осуществления замена на остаток цистеина представляет собой A62C в SEQ ID NO: 1 и R12C в SEQ ID NO: 2. В конкретном варианте осуществления замена на остаток цистеина представляет собой G63C в SEQ ID NO: 1 и Y67C в SEQ ID NO: 2. В других конкретных вариантах осуществления замены на остаток цистеина могут быть выбраны из двух или трех пар из R60C/Y26C, A62C/R12C и G63C/Y67C, описанных выше.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены в сконструированном $\alpha 3$ HLA-I и/или сконструированном $\beta 2$ -микροглобулине предусматривают аминокислотные замены, которые увеличивают изоэлектрическую точку димера, образованного спаренными доменами биспецифического антитела. Эти аминокислотные замены могут происходить

одновременно в обоих спаренных доменах или в одном из двух спаренных доменов. Как правило, изоэлектрическая точка димера, образованного спаренными доменами, или биспецифического антитела увеличивается до 6,5-9,0, чтобы облегчать протекание технологического процесса и улучшить возможность получения лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления изоэлектрическая точка димера, образованного спаренными доменами, или биспецифического антитела увеличивается до 6,5-8,5, 7,0-8,5, 7,0-9,0, 7,0-7,8, 7,0-8,0, 7,5-7,8 или 7,5-8,0. В некоторых конкретных вариантах осуществления изоэлектрическая точка димера, образованного спаренными доменами, или биспецифического антитела увеличивается до 6,5, 6,7, 6,9, 7,1, 7,3, 7,5, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,2, 8,3, 8,5, 8,7 или 9,0. Изоэлектрическую точку можно определить экспериментально или рассчитать теоретически. Теоретическую изоэлектрическую точку можно рассчитать, например, с применением онлайн-инструмента для вычислительного анализа ExPASy-Compute pI/Mw tool (http://web.expasy.org/compute_pi/).

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены, которые увеличивают изоэлектрическую точку, предусматривают замену в сконструированном $\alpha 3$ HLA-I на положительно заряженную аминокислоту в одном или более положениях из E3, D22, E48, D53, E90 и E101 в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены, которые увеличивают изоэлектрическую точку, предусматривают замену в сконструированном $\beta 2$ -микροглобулине на положительно заряженную аминокислоту в одном или более положениях из E74, E47, E69, D34, E16, D53, E44, E50 и E36 в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 2.

В некоторых конкретных вариантах осуществления аминокислотные замены, которые увеличивают изоэлектрическую точку, предусматривают замену в сконструированном $\alpha 3$ HLA-I на положительно заряженную аминокислоту в положениях D22, E48 и D53 в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1, и замену в сконструированном $\beta 2$ -микροглобулине на положительно заряженную аминокислоту в положении E69 в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления положительно заряженная аминокислота представляет собой К или R.

В более конкретном варианте осуществления аминокислотные замены, которые увеличивают изоэлектрическую точку, предусматривают аминокислотные замены D22R, E48K и D53K, содержащиеся в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1, в случае сконструированного $\alpha 3$ HLA-I, и аминокислотную замену E69R, содержащуюся в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 2, в случае сконструированного $\beta 2$ -микрोगлобулина.

В некоторых более конкретных вариантах осуществления аминокислотные замены предусматривают аминокислотные замены A62C, D22R, E48K и D53K, содержащиеся в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1, в случае сконструированного $\alpha 3$ HLA-I, и аминокислотные замены R12C и E69R, содержащиеся в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 2, в случае сконструированного $\beta 2$ -микрोगлобулина. В дополнительном варианте осуществления сконструированный $\beta 2$ -микрोगлобулин содержит «GP», добавленный на карбоксильном конце в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 2.

В конкретном варианте осуществления сконструированный $\alpha 3$ HLA-I содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3, и сконструированный $\beta 2$ -микрोगлобулин содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4.

В другом конкретном варианте осуществления сконструированный $\alpha 3$ HLA-I содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3, и сконструированный $\beta 2$ -микрोगлобулин содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления вторая антигенсвязывающая часть содержит второй переменный домен тяжелой цепи и второй переменный домен легкой цепи. Вторая антигенсвязывающая часть не содержит первый спаренный домен и второй спаренный домен, описанные в данном документе. В конкретном варианте осуществления вторая антигенсвязывающая часть

содержит Fab. Первая антигенсвязывающая часть и вторая антигенсвязывающая часть специфически связываются с двумя разными антигенами или разными эпитопами одного и того же антигена. В некоторых вариантах осуществления как первая антигенсвязывающая часть, так и вторая антигенсвязывающая часть характеризуются моновалентным связыванием с соответствующими антигенами.

В некоторых вариантах осуществления CL-домен Fab заменен гидрофобной аминокислотой в одном или более из положений T/S114, T/F116 и F118 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления гидрофобная аминокислота выбрана из неароматической группы, например, представляет собой метионин, аланин, валин, изолейцин или лейцин. Частота ошибочного спаривания легких и тяжелых цепей может быть дополнительно снижена путем введения подходящих аминокислотных замен в CL-домен Fab второй антигенсвязывающей части. В конкретном варианте осуществления аминокислота в CL-домене Fab заменена на аланин (A) в положении F118 в соответствии с нумерацией EU. В других вариантах осуществления аминокислота в CL-домене Fab заменена на аланин в положении F118 в соответствии с нумерацией EU, и CL-домен дополнительно содержит другие замены, например, замены, которые дополнительно снижают частоту ошибочного спаривания CL со спаренным доменом, содержащим сконструированный $\alpha 3$ HLA-I.

В некоторых вариантах осуществления CL-домен может быть получен из CL-домена легкой к-цепи человека или CL-домена легкой λ -цепи человека. В конкретном варианте осуществления CL-домен, содержащий F118A, содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 44. В конкретном варианте осуществления аминокислотная последовательность CL-домена, содержащая F118A, представлена под SEQ ID NO: 44.

В некоторых вариантах осуществления CH1-домен Fab может представлять собой CH1-домен IgG (IgG1-4), IgM, IgA, IgD или IgE человека. В конкретном варианте осуществления CH1-домен Fab представляет собой CH1-домен IgG1 человека. В конкретном варианте осуществления CH1-домен содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 34. В

конкретном варианте осуществления аминокислотная последовательность CH1-домена представлена под SEQ ID NO: 34. В конкретном варианте осуществления CH1-домен Fab представляет собой CH1-домен IgG4 человека.

Аминокислотная последовательность, представленная под SEQ ID NO: 34, является следующей:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVV.

Аминокислотная последовательность, представленная под SEQ ID NO: 35, является следующей:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEEC.

Аминокислотная последовательность, представленная под SEQ ID NO: 44, является следующей:

RTVAAPSVFIAPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEEC.

В некоторых конкретных вариантах осуществления аминокислота в CL-доме Fab заменена на аланин в положении F118, и CH1-домен Fab не содержит аминокислотную замену в положении 128 (нумерация EU), положении 141 (нумерация EU), положении 185 (нумерация EU), положении 11 (нумерация IMGT), положении 28 (нумерация IMGT) или положении 139 (нумерация согласно Kabat). В других вариантах осуществления аминокислота в CL-доме Fab заменена на аланин в положении F118 в соответствии с нумерацией EU, и CL-домен дополнительно содержит другие замены (например, замены, которые дополнительно снижают частоту ошибочного спаривания CL со спаренным доменом, содержащим сконструированный $\alpha 3$ HLA-I). CH1-домен Fab не содержит аминокислотную замену в положении 128 (нумерация EU), положении 141 (нумерация EU), положении 185 (нумерация EU), положении 11 (нумерация

IMGT), положении 28 (нумерация IMGT) или положении 139 (нумерация согласно Kabat).

В некоторых конкретных вариантах осуществления аминокислота в CL-домене Fab заменена на аланин в положении F118, и CH1-домен Fab не содержит аминокислотную замену L128F (нумерация EU), A141L (нумерация EU), V185A/L (нумерация EU), L11K/F/W (нумерация IMGT), L28N/R (нумерация IMGT) или A139W/V/I (нумерация согласно Kabat). В других вариантах осуществления аминокислота в CL-домене Fab заменена на аланин в положении F118 в соответствии с нумерацией EU, и CL-домен дополнительно содержит другие замены (например, замены, которые дополнительно снижают частоту ошибочного спаривания CL со спаренным доменом, содержащим сконструированный $\alpha 3$ HLA-I). CH1-домен Fab не содержит аминокислотную замену L128F (нумерация EU), A141L (нумерация EU), V185A/L (нумерация EU), L11K/F/W (нумерация IMGT), L28N/R (нумерация IMGT) или A139W/V/I (нумерация согласно Kabat).

В некоторых конкретных вариантах осуществления аминокислота в CL-домене Fab заменена на аланин в положении F118, и в CH1-домене Fab используется CH1-домен иммуноглобулина дикого типа, например, CH1-домен IgG человека. В других вариантах осуществления аминокислота в CL-домене Fab заменена на аланин в положении F118 в соответствии с нумерацией EU, и CL-домен дополнительно содержит другие замены (например, замены, которые дополнительно снижают частоту ошибочного спаривания CL со спаренным доменом, содержащим сконструированный $\alpha 3$ HLA-I). В CH1-домене Fab используется CH1-домен иммуноглобулина дикого типа, например, CH1-домен IgG (IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4) человека.

В некоторых конкретных вариантах осуществления CL-домен Fab содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 44, и CH1-домен Fab содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с

последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 34. Кроме того, в данном варианте осуществления CL-домен Fab содержит F118A. Кроме того, в данном варианте осуществления CH1-домен Fab представляет собой CH1-домен иммуноглобулина дикого типа, или CH1-домен Fab не содержит аминокислотную замену в положении 128 (нумерация EU), положении 141 (нумерация EU), положении 185 (нумерация EU), положении 11 (нумерация IMGT), положении 28 (нумерация IMGT) или положении 139 (нумерация согласно Kabat).

В некоторых конкретных вариантах осуществления CL-домен Fab содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 44, и CH1-домен Fab содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 34.

В некоторых конкретных вариантах осуществления аминокислотная последовательность CL-домена Fab представлена под SEQ ID NO: 44, и аминокислотная последовательность CH1-домена Fab представлена под SEQ ID NO: 34.

В некоторых вариантах осуществления одна из первой антигенсвязывающей части и второй антигенсвязывающей части связывается со специфической для Т-клеток рецепторной молекулой и/или со специфической для естественных клеток-киллеров рецепторной молекулой, а другая антигенсвязывающая часть связывается с опухлеассоциированным антигеном.

Специфическая для Т-клеток рецепторная молекула обеспечивает связывание Т-клеток с эпитопом/антигеном, представленным другой клеткой, называемой антигенпредставляющей клеткой или APC, и, если присутствуют дополнительные сигналы, обеспечивает активацию им и ответ на него. Специфическая для Т-клеток рецепторная молекула может представлять собой TCR, CD3, CD28, CD134 (также называемый OX40), 4-1BB, CD5 или CD95 (также называемый Fas-рецептором).

Примеры специфической для NK-клеток рецепторной молекулы включают CD16, Fc-рецептор с низкой аффинностью, и NKG2D, и CD2.

Термин «опухлеассоциированный антиген» относится к антигену, который представлен на поверхности опухолевой клетки или может быть представлен на

поверхности опухолевой клетки и может находиться на опухолевой клетке или внутри нее. В некоторых вариантах осуществления опухолеассоциированный антиген может представляться только опухолевыми клетками, а не нормальными, т. е. отличными от опухолевых, клетками. В некоторых других вариантах осуществления опухолеассоциированный антиген может экспрессироваться только на опухолевых клетках или может содержать опухолеспецифическую мутацию по сравнению с клетками, отличными от опухолевых. В некоторых других вариантах осуществления опухолеассоциированный антиген может находиться как в опухолевых клетках, так и в клетках, отличных от опухолевых, но сверхэкспрессируется на опухолевых клетках по сравнению с клетками, отличными от опухолевых, или может связываться с антителом в опухолевых клетках вследствие менее компактной структуры опухолевых тканей по сравнению тканями, отличными от опухолевых. В некоторых вариантах осуществления опухолеассоциированный антиген находится в сосудистой сети опухоли. Некоторые иллюстративные опухолеассоциированные антигены представляют собой CD38, CD47, PD-L1, PD-1 и т. п.

В некоторых вариантах осуществления одна из первой антигенсвязывающей части и второй антигенсвязывающей части специфически связывается с CD3, а другая специфически связывается с опухолеассоциированным антигеном. Например, первая антигенсвязывающая часть специфически связывается с CD3, а вторая антигенсвязывающая часть специфически связывается с опухолеассоциированным антигеном, или вторая антигенсвязывающая часть специфически связывается с CD3, а первая антигенсвязывающая часть специфически связывается с опухолеассоциированным антигеном. В некоторых конкретных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая часть специфически связывается с CD3, а вторая антигенсвязывающая часть специфически связывается с CD38, или первая антигенсвязывающая часть специфически связывается с CD38, а вторая антигенсвязывающая часть специфически связывается с CD3.

В некоторых вариантах осуществления как первая антигенсвязывающая часть, так и вторая антигенсвязывающая часть специфически связываются с

опухолеассоциированными антигенами. В некоторых конкретных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая часть специфически связывается с PD-L1, а вторая антигенсвязывающая часть специфически связывается с CD47, или первая антигенсвязывающая часть специфически связывается с CD47, а вторая антигенсвязывающая часть специфически связывается с PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело дополнительно содержит Fc-домен, состоящий из двух Fc-полипептидов, способных к стабильной ассоциации. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело является бивалентным.

В некоторых вариантах осуществления первая антигенсвязывающая часть функционально связана на своем С-конце с N-концом одного из Fc-полипептидов, и вторая антигенсвязывающая часть функционально связана на своем С-конце с N-концом другого Fc-полипептида. В некоторых более конкретных вариантах осуществления первый полипептид первой антигенсвязывающей части функционально связан на своем С-конце с N-концом одного из Fc-полипептидов, и вторая антигенсвязывающая часть содержит Fab, и тяжелая цепь Fab второй антигенсвязывающей части функционально связана на своем С-конце с N-концом другого Fc-полипептида. В некоторых более конкретных вариантах осуществления первый полипептид первой антигенсвязывающей части функционально связан на своем С-конце с N-концом одного из Fc-полипептидов, и вторая антигенсвязывающая часть содержит Fab, и легкая цепь Fab второй антигенсвязывающей части функционально связана на своем С-конце с N-концом другого Fc-полипептида.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело дополнительно содержит третью антигенсвязывающую часть. В некоторых конкретных вариантах осуществления связывание биспецифического антитела с антигеном является тривалентным.

В некоторых вариантах осуществления третья антигенсвязывающая часть связывается с тем же эпитопом антигена, что и вторая антигенсвязывающая часть; предпочтительно третья антигенсвязывающая часть является идентичной второй антигенсвязывающей части. В других вариантах осуществления третья антигенсвязывающая часть связывается с тем же эпитопом антигена, что и

первая антигенсвязывающая часть; предпочтительно третья антигенсвязывающая часть является идентичной первой антигенсвязывающей части.

В некоторых вариантах осуществления третья антигенсвязывающая часть функционально связана с N-концом или C-концом первой антигенсвязывающей части.

В других вариантах осуществления третья антигенсвязывающая часть функционально связана с N-концом или C-концом второй антигенсвязывающей части.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело содержит третью антигенсвязывающую часть и дополнительно содержит Fc-домен, состоящий из двух Fc-полипептидов, способных к стабильной ассоциации.

В некоторых конкретных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая часть функционально связана на своем C-конце с N-концом одного из Fc-полипептидов, вторая антигенсвязывающая часть функционально связана на своем C-конце с N-концом другого Fc-полипептида, и третья антигенсвязывающая часть функционально связана на своем C-конце с N-концом первой антигенсвязывающей части или N-концом второй антигенсвязывающей части.

В других конкретных вариантах осуществления третья антигенсвязывающая часть функционально связана на своем C-конце с N-концом одного из Fc-полипептидов, первая антигенсвязывающая часть функционально связана на своем C-конце с N-концом третьей антигенсвязывающей части, и вторая антигенсвязывающая часть функционально связана на своем C-конце с N-концом другого Fc-полипептида.

В других конкретных вариантах осуществления третья антигенсвязывающая часть функционально связана на своем C-конце с N-концом одного из Fc-полипептидов, вторая антигенсвязывающая часть функционально связана на своем C-конце с N-концом третьей антигенсвязывающей части, и первая антигенсвязывающая часть функционально связана на своем C-конце с

N-концом другого Fc-полипептида.

Третья антигенсвязывающая часть, описанная выше, может быть функционально связана с первой антигенсвязывающей частью посредством пептидного линкера.

Третья антигенсвязывающая часть, описанная выше, может быть функционально связана со второй антигенсвязывающей частью посредством пептидного линкера. Пептидный линкер может представлять собой любой подходящий, например, электрически заряженный и/или гибкий, линкерный полипептид. В конкретном варианте осуществления пептидный линкер состоит из 1-50 аминокислот, связанных пептидными связями, где аминокислоты могут быть выбраны из 20 встречающихся в природе аминокислот; в более предпочтительном варианте осуществления 1-50 аминокислот выбраны из глицина, аланина, пролина, серина, аспарагина, глутамина и лизина. Таким образом, иллюстративные пептидные линкеры могут представлять собой полиглицины (в частности (Gly)₄ и (Gly)₅), поли(Gly-Ser), (Gly)₃AsnGlySer(Gly)₂, (Gly)₃Cys(Gly)₄, GlyProAsnGlyGly или линкеры, раскрытые в таблице 4 заявки на патент WO2019195535, и т. п. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер может представлять собой пептидный линкер, состоящий из глицина и серина. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер может содержать 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше аминокислот.

Если антигенсвязывающая часть функционально связана с Fc-доменом или Fc-полипептидом, она, как правило, связана посредством шарнирной области. Например, шарнир содержит аминокислоты шарнирной области IgG человека.

Fc-домен

Fc-домен биспецифического антитела состоит из пары полипептидных цепей, содержащих домен тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина. Например, Fc-домен молекулы иммуноглобулина G (IgG) представляет собой димер, и каждый из Fc-полипептидов содержит константные области CH₂ и CH₃ тяжелой цепи IgG. Два Fc-полипептида Fc-домена способны к стабильной ассоциации друг с другом. Например, два Fc-полипептида стабильно ассоциированы

посредством одного или более из линкера, дисульфидной связи, водородной связи, электростатического взаимодействия, солевого мостика и гидрофобно-гидрофильного взаимодействия. В одном варианте осуществления биспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит один Fc-домен.

В одном варианте осуществления Fc-домен биспецифического антитела представляет собой Fc-домен IgG. В конкретном варианте осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1. В другом варианте осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG4. В более конкретном варианте осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG4, содержащий аминокислотную замену в положении S228, в частности аминокислотную замену S228P, которая обеспечивает снижение обмена Fab-плечами для антитела IgG4 *in vivo*. В еще одном конкретном варианте осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен человека. В более конкретном варианте осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1 человека.

В некоторых вариантах осуществления Fc-домен содержит модификацию, такую как аминокислотная замена. Модификация может представлять собой, например, модификацию, которая стимулирует гетеродимеризацию, модификацию, которая изменяет эффекторную функцию, модификацию, которая изменяет способность к связыванию с белком A, или т. п.

В некоторых вариантах осуществления Fc-домен содержит модификацию, которая стимулирует гетеродимеризацию.

Биспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит разные антигенсвязывающие части, слитые с одним из двух Fc-полипептидов в Fc-домене, при этом два Fc-полипептида, как правило, содержатся в двух разных полипептидных цепях. Несколько возможных комбинаций двух полипептидов получают путем рекомбинантной совместной экспрессии и последующей димеризации этих полипептидов. С целью увеличения выхода и чистоты биспецифического антитела при рекомбинантном получении будет преимуществом введение модификации, которая стимулирует связывание требуемых полипептидов с получением Fc-домена биспецифического антитела.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления Fc-домен содержит аминокислотную замену, которая стимулирует ассоциацию двух Fc-полипептидов Fc-домена.

Участок для наиболее обширного белок-белкового взаимодействия между двумя Fc-полипептидами Fc-домена IgG человека находится в СНЗ-доме Fc-домена. Таким образом, в одном варианте осуществления модификация находится в СНЗ-доме Fc-домена.

В конкретном варианте осуществления модификация представляет собой так называемую модификацию типа «выступ-в-углубление», которая предусматривает модификацию типа «выступ» в одном из двух Fc-полипептидов Fc-домена и модификацию типа "углубление" в другом из двух Fc-полипептидов Fc-домена. Обычно способ включает введение выпуклости («выступа») в зоне контакта одного Fc-полипептида и соответствующей полости («углубления») в зоне контакта другого Fc-полипептида таким образом, что выпуклость может быть расположена в полости, для стимуляции образования гетеродимера и препятствования образованию гомодимера. Выпуклость конструируют путем замены небольшой боковой цепи аминокислоты в зоне контакта одного Fc-полипептида на более длинную боковую цепь (например, тирозина или триптофана и т. п.). Комплементарную полость такого же или подобного размера, что и выпуклость, получают в зоне контакта другого Fc-полипептида путем замены длинной боковой цепи аминокислоты на меньшую боковую цепь аминокислоты (например, аланина или треонина и т. п.).

Таким образом, в конкретном варианте осуществления аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток с большим объемом боковой цепи в СНЗ-доме одного Fc-полипептида биспецифического антитела с получением таким образом выпуклости в пределах СНЗ-домена Fc-полипептида, которая может быть расположена в полости в пределах СНЗ-домена другого Fc-полипептида, и при этом в пределах СНЗ-домена другого Fc-полипептида аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток с меньшим объемом боковой цепи с получением таким образом полости в пределах СНЗ-домена Fc-полипептида.

В некоторых конкретных вариантах осуществления один Fc-полипептид Fc-домена содержит T366Y/W и/или S354C, а другой Fc-полипептид содержит Y407T/V, Y349C, T366S и/или L368A. В более конкретном варианте осуществления один из Fc-полипептидов Fc-домена содержит аминокислотные замены T366Y/W и S354C, а другой Fc-полипептид содержит аминокислотные замены Y407T/V, Y349C, T366S и L368A. В более конкретном варианте осуществления Fc может представлять собой Fc IgG1 человека.

В некоторых вариантах осуществления Fc-домен содержит модификацию, которая обеспечивает снижение или устранение связывания СНЗ-области одного Fc-полипептида в Fc-домене с белком А (из *Staphylococcus aureus*). В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой аминокислотную замену. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен содержит аминокислотную замену H435R и/или Y436F, которая встречается только в одном Fc-полипептиде, но не в другом Fc-полипептиде. В конкретном варианте осуществления Fc-домен содержит аминокислотную замену H435R и/или Y436F, которая встречается только в одном из Fc-полипептидов. В одном таком конкретном варианте осуществления Fc представляет собой Fc IgG1, в частности Fc IgG1 человека.

Композиция

В настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическое антитело и дополнительно содержащая один или более фармацевтически приемлемых носителей. Фармацевтически приемлемые носители включают, например, вспомогательные вещества, разбавители, инкапсулирующие материалы, наполнители, буферы или другие средства.

Выделенная нуклеиновая кислота

В настоящем изобретении предусмотрен выделенный полинуклеотид, кодирующий биспецифическое антитело. Последовательности нуклеиновой кислоты полипептидных цепей некоторых биспецифических антител для иллюстрации перечислены в перечне последовательностей.

Вектор

В настоящем изобретении предусмотрен выделенный вектор, содержащий

полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой клонирующий вектор; в других вариантах осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии; в конкретном варианте осуществления вектор экспрессии представляет собой рсDNA3.1. Вектор экспрессии необязательно представляет собой любой вектор экспрессии, способный экспрессировать полиспецифическое антитело, описанное в данном документе.

Клетка-хозяин

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена клетка-хозяин, содержащая вектор или полинуклеотид, описанный в данном документе, при этом клетка-хозяин является подходящей клеткой-хозяином для применения в клонировании или кодировании полиспецифического антитела. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку. В других вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин выбрана из дрожжевой клетки, клетки млекопитающего или других клеток, подходящих для получения полиспецифического антитела. Клетка млекопитающего представляет собой, например, клетки яичника китайского хомячка (СНО) или клетки СНО-S.

Способы обеспечения экспрессии биспецифического антитела

В настоящем изобретении предусмотрен способ обеспечения экспрессии биспецифического антитела, описанного в данном документе, включающий культивирование клетки-хозяина в таких условиях, в которых экспрессируется биспецифическое антитело.

Для получения биспецифического антитела выделяют полинуклеотид, кодирующий биспецифическое антитело, и вставляют в один или более векторов для последующего применения в клонировании и/или экспрессии в клетке-хозяине. Полинуклеотид может быть получен с применением различных способов, известных из уровня техники, таких как сплайсинг генов и химический синтез.

Конъюгат

В настоящем изобретении предусмотрен конъюгат, содержащий биспецифическое антитело, описанное в данном документе, и терапевтическое средство, связанное или конъюгированное с биспецифическим антителом.

Слитый белок

В настоящем изобретении предусмотрен слитый белок, где слитый компонент экспрессируется посредством слияния с биспецифическим антителом, описанным в данном документе. Конструирование и экспрессию слитой белковой молекулы можно осуществлять способами генетической инженерии.

Применение

В настоящем изобретении предусмотрен способ лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества биспецифического антитела, фармацевтической композиции, конъюгата или слитого белка, описанного в данном документе.

Заболевание может представлять собой рак, и неограничивающие примеры некоторых видов рака выбраны из лейкоза, лимфомы, миеломы, рака яичника, рака молочной железы, рака эндометрия, рака толстой кишки, ректального рака, рака почки, рака мочевого пузыря, уротелиального рака, рака легкого, бронхиального рака, рака кости, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, гепатоцеллюлярной карциномы, рака желчного пузыря, рака желчных протоков, рака пищевода, почечноклеточного рака, рака щитовидной железы, рака головы и шеи, рака яичка, эндокринной аденокарциномы, рака надпочечника, рака гипофиза, рака кожи, рака мягких тканей, рака сосудистой системы, рака головного мозга, рака нервной системы, рака глаза, рака мозговой оболочки, рака ротоглотки, рака гортаноглотки, рака шейки матки, рака матки, глиобластомы, медуллобластомы, астроцитомы, глиомы, менингиомы, гастриномы, нейробластомы, меланомы, миелодиспластического синдрома и саркомы.

В настоящем изобретении дополнительно без ограничения предусмотрены следующие варианты осуществления.

Вариант осуществления 1. Биспецифическое антитело, содержащее первую

антигенсвязывающую часть и вторую антигенсвязывающую часть, которое специфически связывается с двумя разными антигенами или разными эпитопами одного и того же антигена, где первая антигенсвязывающая часть содержит:

первый полипептид, содержащий от N-конца к C-концу: первый переменный домен тяжелой цепи и первый спаренный домен, функционально связанный с первым переменным доменом тяжелой цепи, и

второй полипептид, содержащий от N-конца к C-концу: первый переменный домен легкой цепи и второй спаренный домен, функционально связанный с первым переменным доменом легкой цепи,

где один из первого спаренного домена и второго спаренного домена содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\alpha 3$ HLA-I, а другой спаренный домен содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\beta 2$ -микροглобулина.

Вариант осуществления 2. Биспецифическое антитело в соответствии с вариантом осуществления 1, где первый спаренный домен и второй спаренный домен способны образовывать димер, возможно образование по меньшей мере одной неприродной межцепочечной связи между первым спаренным доменом и вторым спаренным доменом, и при этом неприродная межцепочечная связь способна стабилизировать димер.

Вариант осуществления 3. Биспецифическое антитело в соответствии с вариантом осуществления 1 или 2, где первый спаренный домен содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\alpha 3$ HLA-I, и второй спаренный домен содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\beta 2$ -микροглобулина.

Вариант осуществления 4. Биспецифическое антитело в соответствии с вариантом осуществления 1 или 2, где первый спаренный домен содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\beta 2$ -микροглобулина, и второй спаренный домен содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\alpha 3$ HLA-I.

Вариант осуществления 5. Биспецифическое антитело в соответствии с любым

из вариантов осуществления 1-4, где количество неприродных межцепочечных связей составляет 1-3, предпочтительно 1.

Вариант осуществления 6. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-5, где аминокислотные остатки, образующие неприродную межцепочечную связь, находятся в зоне контакта первого спаренного домена и второго спаренного домена.

Вариант осуществления 7. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-6, где неприродная межцепочечная связь представляет собой дисульфидную связь.

Вариант осуществления 8. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-7, где аминокислотная последовательность сконструированного $\alpha 3$ HLA-I характеризуется по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 1, и аминокислотная последовательность сконструированного $\beta 2$ -микροглобулина характеризуется по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 2.

Вариант осуществления 9. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8, где сконструированный $\alpha 3$ HLA-I содержит аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную замену в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1, и сконструированный $\beta 2$ -микροглобулин содержит аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную замену в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 2.

Вариант осуществления 10. Биспецифическое антитело в соответствии с вариантом осуществления 9, где аминокислотные замены как в сконструированном $\alpha 3$ HLA-I, так и в сконструированном $\beta 2$ -микροглобулине предусматривают замены на остаток цистеина, которые происходят в зоне контакта между ними двумя и способны образовывать дисульфидную связь друг с другом.

Вариант осуществления 11. Биспецифическое антитело в соответствии с вариантом осуществления 10, где замена на остаток цистеина выбрана из одной или более пар в следующей группе:

- (1) R60C в SEQ ID NO: 1 и Y26C в SEQ ID NO: 2;
- (2) A62C в SEQ ID NO: 1 и R12C в SEQ ID NO: 2 и
- (3) G63C в SEQ ID NO: 1 и Y67C в SEQ ID NO: 2.

Вариант осуществления 12. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 9-11, где аминокислотные замены в сконструированном $\alpha 3$ HLA-I и/или сконструированном $\beta 2$ -микροглобулине предусматривают аминокислотные замены, которые увеличивают изоэлектрическую точку димера, образованного спаренными доменами, или биспецифического антитела.

Вариант осуществления 13. Биспецифическое антитело в соответствии с вариантом осуществления 12, где изоэлектрическая точка димера, образованного спаренными доменами, или биспецифического антитела увеличивается до 6,5-9,0.

Вариант осуществления 14. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 12-13, где аминокислотные замены, которые увеличивают изоэлектрическую точку, предусматривают замену в сконструированном $\alpha 3$ HLA-I на положительно заряженную аминокислоту в одном или более положениях из E3, D22, E48, D53, E90 и E101 в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1.

Вариант осуществления 15. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 12-14, где аминокислотные замены, которые увеличивают изоэлектрическую точку, предусматривают замену в сконструированном $\beta 2$ -микροглобулине на положительно заряженную аминокислоту в одном или более положениях из E74, E47, E69, D34, E16, D53, E44, E50 и E36 в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 2.

Вариант осуществления 16. Биспецифическое антитело в соответствии с вариантом осуществления 15, где аминокислотные замены, которые увеличивают изоэлектрическую точку, предусматривают замену в

сконструированном $\alpha 3$ HLA-I на положительно заряженную аминокислоту в положениях D22, E48 и D53 в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1, и замену в сконструированном $\beta 2$ -микροглобулине на положительно заряженную аминокислоту в положении E69 в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 2.

Вариант осуществления 17. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 14-16, где положительно заряженная аминокислота представляет собой K или R.

Вариант осуществления 18. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 12-13, где аминокислотные замены, которые увеличивают изоэлектрическую точку, предусматривают аминокислотные замены D22R, E48K и D53K, содержащиеся в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1, в случае сконструированного $\alpha 3$ HLA-I, и аминокислотную замену E69R, содержащуюся в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 2, в случае сконструированного $\beta 2$ -микροглобулина.

Вариант осуществления 19. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-18, где сконструированный $\alpha 3$ HLA-I содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3, и сконструированный $\beta 2$ -микροглобулин содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4.

Вариант осуществления 20. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-18, где сконструированный $\alpha 3$ HLA-I содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3, и сконструированный $\beta 2$ -микροглобулин содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5.

Вариант осуществления 21. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-20, где вторая антигенсвязывающая часть содержит второй вариабельный домен тяжелой цепи и второй вариабельный домен легкой цепи.

Вариант осуществления 22. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-21, где вторая антигенсвязывающая часть содержит Fab.

Вариант осуществления 23. Биспецифическое антитело в соответствии с вариантом осуществления 22, где аминокислота в CL-домене Fab заменена на аланин в положении F118 в соответствии с нумерацией EU.

Вариант осуществления 24. Биспецифическое антитело в соответствии с вариантом осуществления 23, при этом CL-домен содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 44.

Вариант осуществления 25. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-24, где одна из первой антигенсвязывающей части и второй антигенсвязывающей части связывается со специфической для Т-клеток рецепторной молекулой и/или со специфической для естественных клеток-киллеров рецепторной молекулой, а другая антигенсвязывающая часть связывается с опухлеассоциированным антигеном.

Вариант осуществления 26. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-24, где одна из первой антигенсвязывающей части и второй антигенсвязывающей части специфически связывается с CD3, а другая специфически связывается с опухлеассоциированным антигеном.

Вариант осуществления 27. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-24, где как первая антигенсвязывающая часть, так и вторая антигенсвязывающая часть специфически связываются с опухлеассоциированными антигенами.

Вариант осуществления 28. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 25-27, где опухлеассоциированный антиген представляет собой CD38, CD47, PD-L1 или PD-1.

Вариант осуществления 29. Биспецифическое антитело в соответствии с вариантом осуществления 26, где первая антигенсвязывающая часть специфически связывается с CD3, а вторая антигенсвязывающая часть

специфически связывается с CD38, или первая антигенсвязывающая часть специфически связывается с CD38, а вторая антигенсвязывающая часть специфически связывается с CD3.

Вариант осуществления 30. Биспецифическое антитело в соответствии с вариантом осуществления 27, где первая антигенсвязывающая часть специфически связывается с PD-L1, а вторая антигенсвязывающая часть специфически связывается с CD47, или первая антигенсвязывающая часть специфически связывается с CD47, а вторая антигенсвязывающая часть специфически связывается с PD-L1.

Вариант осуществления 31. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-30, где биспецифическое антитело является бивалентным.

Вариант осуществления 32. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-30, дополнительно содержащее третью антигенсвязывающую часть, где третья антигенсвязывающая часть связывается с тем же эпитопом антигена, что и вторая антигенсвязывающая часть; предпочтительно третья антигенсвязывающая часть является идентичной второй антигенсвязывающей части.

Вариант осуществления 33. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-30, дополнительно содержащее третью антигенсвязывающую часть, где третья антигенсвязывающая часть связывается с тем же эпитопом антигена, что и первая антигенсвязывающая часть; предпочтительно третья антигенсвязывающая часть является идентичной первой антигенсвязывающей части.

Вариант осуществления 34. Биспецифическое антитело в соответствии с вариантом осуществления 32 или 33, где третья антигенсвязывающая часть функционально связана с N-концом или C-концом первой антигенсвязывающей части.

Вариант осуществления 35. Биспецифическое антитело в соответствии с вариантом осуществления 32 или 33, где третья антигенсвязывающая часть

функционально связана с N-концом или C-концом второй антигенсвязывающей части.

Вариант осуществления 36. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 32-35, где биспецифическое антитело является тривалентным.

Вариант осуществления 37. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-31, дополнительно содержащее Fc-домен, состоящий из двух Fc-полипептидов, способных к стабильной ассоциации.

Вариант осуществления 38. Биспецифическое антитело в соответствии с вариантом осуществления 37, где первая антигенсвязывающая часть функционально связана на своем C-конце с N-концом одного из Fc-полипептидов, и вторая антигенсвязывающая часть функционально связана на своем C-конце с N-концом другого Fc-полипептида.

Вариант осуществления 39. Биспецифическое антитело в соответствии с вариантом осуществления 38, где первый полипептид первой антигенсвязывающей части функционально связан на своем C-конце с N-концом одного из Fc-полипептидов, и вторая антигенсвязывающая часть содержит Fab, и тяжелая цепь Fab второй антигенсвязывающей части функционально связана на своем C-конце с N-концом другого Fc-полипептида.

Вариант осуществления 40. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 32-36, дополнительно содержащее Fc-домен, состоящий из двух Fc-полипептидов, способных к стабильной ассоциации.

Вариант осуществления 41. Биспецифическое антитело в соответствии с вариантом осуществления 40, где первая антигенсвязывающая часть функционально связана на своем C-конце с N-концом одного из Fc-полипептидов, вторая антигенсвязывающая часть функционально связана на своем C-конце с N-концом другого Fc-полипептида, и третья антигенсвязывающая часть функционально связана на своем C-конце с N-концом первой антигенсвязывающей части или N-концом второй антигенсвязывающей части.

Вариант осуществления 42. Биспецифическое антитело в соответствии с вариантом осуществления 40, где третья антигенсвязывающая часть функционально связана на своем С-конце с N-концом одного из Fc-полипептидов, первая антигенсвязывающая часть функционально связана на своем С-конце с N-концом третьей антигенсвязывающей части, и вторая антигенсвязывающая часть функционально связана на своем С-конце с N-концом другого Fc-полипептида.

Вариант осуществления 43. Биспецифическое антитело в соответствии с вариантом осуществления 40, где третья антигенсвязывающая часть функционально связана на своем С-конце с N-концом одного из Fc-полипептидов, вторая антигенсвязывающая часть функционально связана на своем С-конце с N-концом третьей антигенсвязывающей части, и первая антигенсвязывающая часть функционально связана на своем С-конце с N-концом другого Fc-полипептида.

Вариант осуществления 44. Биспецифическое антитело в соответствии с вариантами осуществления 41-43, где третья антигенсвязывающая часть функционально связана с первой антигенсвязывающей частью посредством пептидного линкера, или третья антигенсвязывающая часть функционально связана со второй антигенсвязывающей частью посредством пептидного линкера.

Вариант осуществления 45. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 37-44, где Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG.

Вариант осуществления 46. Биспецифическое антитело в соответствии с вариантом осуществления 45, где Fc-домен IgG представляет собой Fc-домен IgG человека, предпочтительно Fc-домен IgG1 человека или IgG4 человека.

Вариант осуществления 47. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 37-46, где два Fc-полипептида стабильно ассоциированы посредством одного или более из линкера, дисульфидной связи, водородной связи, электростатического взаимодействия, солевого мостика и гидрофобно-гидрофильного взаимодействия.

Вариант осуществления 48. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 37-47, где Fc-домен содержит модификацию, которая стимулирует ассоциацию двух Fc-полипептидов Fc-домена.

Вариант осуществления 49. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 37-48, где один Fc-полипептид содержит T366Y/W и S354C, а другой Fc-полипептид содержит Y407T/V, Y349C, T366S и L368A в соответствии с нумерацией EU.

Вариант осуществления 50. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 37-49, где Fc-домен содержит модификацию, которая обеспечивает снижение или устранение связывания СН3-области одного Fc-полипептида в Fc с белком А.

Вариант осуществления 51. Биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 37-50, где в соответствии с нумерацией EU Fc-домен содержит аминокислотную замену H435R и/или Y436F, которая встречается только в одном из Fc-полипептидов.

Вариант осуществления 52. Выделенный полинуклеотид, кодирующий биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-51.

Вариант осуществления 53. Выделенный вектор, содержащий полинуклеотид в соответствии с вариантом осуществления 52.

Вариант осуществления 54. Клетка-хозяин, содержащая выделенный полинуклеотид в соответствии с вариантом осуществления 52 или выделенный вектор в соответствии с вариантом осуществления 51.

Вариант осуществления 55. Способ обеспечения экспрессии биспецифического антитела в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-51, включающий культивирование клетки-хозяина в соответствии с вариантом осуществления 52 в таких условиях, в которых экспрессируется биспецифическое антитело.

Вариант осуществления 56. Фармацевтическая композиция, содержащая

биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-51 и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 57. Конъюгат, содержащий биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-51 и терапевтическое средство, связанное или конъюгированное с биспецифическим антителом.

Вариант осуществления 58. Слитый белок, содержащий слитый компонент, экспрессированный посредством слияния, и биспецифическое антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-51.

Вариант осуществления 59. Способ лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества биспецифического антитела в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-51, фармацевтической композиции в соответствии с вариантом осуществления 56, конъюгата в соответствии с вариантом осуществления 57 или слитого белка в соответствии с вариантом осуществления 58.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Пример 1. Моделирование последовательностей элемента MHC-I

В соответствии со статистическими данными из базы данных IPD-IMGT/HLA (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>) (версия 3.42) (таблица 1) HLA-I содержит большее количество аллелей и имеет более широкое распространение относительно HLA-II, поэтому для снижения риска иммуногенности для моделирования структурных элементов биспецифических антител были выбраны молекулы HLA-I.

В соответствии со статистическими данными из базы данных IPD-IMGT/HLA (версия 3.42) (таблица 2) количество аллелей HLA-I-B среди всех молекул HLA-I является наибольшим, и поэтому для дополнительного снижения риска иммуногенности для моделирования структурных элементов биспецифических антител были выбраны молекулы HLA-I-B.

Таблица 1. Количество аллелей HLA

Аллель	Количество
HLA-I	20597
HLA-II	7723
HLA	28320

Таблица 2. Аллели и белки HLA-I

Тип	A	B	C	E	F	G
Аллели	6291	7562	6223	256	45	82
Белки	3896	4803	3618	110	6	22
Нулевые аллели	325	253	272	7	0	4

1.1. Определение исходных последовательностей элемента MHC-I

В базе данных Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) получали ряд полноразмерных последовательностей α -цепи природных молекул HLA-I-B (таблица 3); в базе данных Uniprot получали полноразмерную последовательность β -цепи (также называемую β -микροглобулином) молекул HLA-I (Uniprot ID: P61769). Дополнительно получали информацию о кристаллической структуре белков, содержащих α -цепь молекулы HLA-I-B, с помощью системы перекрестных ссылок на странице базы данных Uniprot и выбирали кристаллические структуры с высоким разрешением (разрешение $< 2 \text{ \AA}$) с целью обеспечения точности данных о кристаллической структуре (таблица 4).

Относительные начальные положения константных областей α -цепи (определенные в данном документе как MHC1C α , константная область альфа MHC I или просто C α) природной молекулы HLA-I-B определяли посредством анализа последовательностей в комбинации с информацией об этих кристаллических структурах. Имело место определенное расхождение последовательностей в константной области α -цепи молекулы HLA-I-B. Последовательности в таблице 3 подвергали множественному выравниванию последовательностей с применением инструмента для выравнивания в режиме онлайн ClustalW2 (https://www.ebi.ac.uk/Tools/phylogeny/simple_phylogeny/), а затем результаты выравнивания анализировали и отображали с помощью

webLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>). Консенсусную последовательность константной области α -цепи молекулы HLA-I-B (фиг. 1) получали в соответствии с частотой встречаемости аминокислот в каждом положении, и консенсусную последовательность константной области α -цепи молекулы HLA-I-B использовали в качестве исходной последовательности для последующего применения и модификации. Поскольку не было расхождения последовательностей β 2-микροглобулина человека, последовательность спаренной области (определенную в данном документе как MHC1C β , константная область бета MHC I или просто C β) природного β 2-микροглобулина с MHC1C α определяли посредством анализа последовательности (ID Uniprot: P61769).

Исходные последовательности элемента MHC-I были следующими:

> MHC1C α ori (SEQ ID NO: 1)

GKETLQRADPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQ
DTELVETRPAGDRTFQKWA AVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEPS

> MHC1C β ori (SEQ ID NO: 2)

IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDL
SFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWDR

Таблица 3. Информация о последовательностях α -цепи природной молекулы HLA-I-B, содержащаяся в базе данных Uniprot

№	Номер доступа в Uniprot
1	A0A140T9S9
2	A0A140T9G0
3	A0A140T9H3
4	A0A140T9A9
5	A0A140T951
6	A0A1W2PPR8
7	D9J307

8	S6AU73
9	Q2L6G2
10	D5H3J5
11	Q5SS57
12	P30685
13	P01889

Таблица 4. Кристаллические структуры белков, содержащих α -цепь молекулы

HLA-I-B

№	Номер доступ а в PDB	Разреш ение (Å)	№	Номер доступ а в PDB	Разреше ние (Å)	№	Номер доступ а в PDB	Разре шение (Å)	№	Номер доступ а в PDB	Разре шение (Å)
1	1K5N	1,09	31	6PYL	1,52	61	1N2R	1,7	91	4O2C	1,8
2	4U1M	1,18	32	6PZ5	1,53	62	1SYV	1,7	92	4PR5	1,8
3	3CZF	1,2	33	1UXS	1,55	63	1ZSD	1,7	93	5IEK	1,8
4	6MT3	1,21	34	3VFF	1,55	64	2NW3	1,7	94	5VUE	1,8
5	3BWA	1,3	35	6MT4	1,55	65	3DX6	1,7	95	5VWD	1,8
6	3LN4	1,3	36	6MT5	1,55	66	3L3I	1,7	96	5VWF	1,8
7	3SPV	1,3	37	5WM R	1,58	67	3VCL	1,7	97	5WMN	1,82
8	6MT6	1,31	38	6BXQ	1,58	68	4QRQ	1,7	98	5DEG	1,83
9	2BVP	1,35	39	4U1H	1,59	69	5EO0	1,7	99	6D2R	1,83
10	6MTL	1,35	40	6P23	1,59	70	5TXS	1,7	100	3KPQ	1,84
11	4U1J	1,38	41	6P27	1,59	71	5XOS	1,7	101	3BP4	1,85
12	6PYW	1,38	42	1M6O	1,6	72	1UXW	1,71	102	3VFS	1,85
13	2A83	1,4	43	1ZHK	1,6	73	3D18	1,74	103	5EO1	1,85
14	4QRS	1,4	44	3DX7	1,6	74	3BW9	1,75	104	3B3I	1,86
15	4QRT	1,4	45	3KPM	1,6	75	6BJ8	1,75	105	3C9N	1,87
16	5WM Q	1,4	46	3SKO	1,6	76	4U1S	1,76	106	6D29	1,88
17	6P2C	1,4	47	3VRI	1,6	77	5T6Y	1,76	107	1JGD	1,9
18	4XXC	1,43	48	4G8I	1,6	78	4U1N	1,77	108	1M05	1,9
19	5IB2	1,44	49	4G9D	1,6	79	1XR9	1,79	109	2H6P	1,9
20	6PYJ	1,44	50	4LCY	1,6	80	2AXF	1,8	110	3KPP	1,9
21	6BXP	1,45	51	4QRU	1,6	81	3B6S	1,8	111	3LKS	1,9
22	6PYV	1,45	52	5DEF	1,6	82	3BP7	1,8	112	3LN5	1,9

23	1OGT	1,47	53	5WMP	1,6	83	3L3D	1,8	113	3VRJ	1,9
24	1XH3	1,48	54	5WM O	1,62	84	3LKO	1,8	114	4G9F	1,9
25	6P2F	1,48	55	2BVO	1,65	85	3LKP	1,8	115	4JQX	1,9
26	1ZHL	1,5	56	3VFU	1,65	86	3LKQ	1,8	116	4O2F	1,9
27	2HJL	1,5	57	4PRN	1,65	87	3SKM	1,8	117	5T6W	1,9
28	4JQV	1,5	58	5VWH	1,65	88	3VH8	1,8	118	5VUF	1,9
29	5IEN	1,5	59	6P2S	1,65	89	3X12	1,8	119	6BJ3	1,9
30	6AT5	1,5	60	5T6X	1,69	90	3X13	1,8	120	6D2T	1,9

1.2. Оптимизация исходных последовательностей элемента МНС-I

1.2.1. Введение межцепочечных дисульфидных связей для улучшения стабильности спаривания элемента МНС-I

Аминокислотные последовательности МНСI α o β i и МНСI β o α i, описанные выше, загружали в программное обеспечение Molecular Operating Environment (МОЕ) и проводили моделирование гетеродимеров из последовательностей с помощью модуля гомологичного моделирования МОЕ так, что получали симулированную структуру элемента МНС-I. В природном состоянии между константными областями молекул МНС не существует дисульфидных связей. Для улучшения стабильности спаривания константных областей МНС-I и оптимизации возможности его разработки в случае МНСI α o β i цистеин (Cys) можно вводить в положение R60, A62 или G63, и в случае МНСI β o α i цистеин (Cys) можно вводить в положение Y26, R12 или Y67, в зоне контакта доменов МНСI α и МНСI β . Дельта-показатель стабильности после введения дисульфидных связей симулировали и рассчитывали с помощью модуля дисульфидного сканирования МОЕ, где если в МНСI α o β i была введена мутация A62C и в МНСI β o α i была введена мутация R12C, наблюдался наименьший дельта-показатель стабильности, составляющий -1,62 ккал/моль, что указывает на то, что мутации в этих двух положениях могут образовывать наиболее стабильную дисульфидную связь в зоне контакта α и β (таблица 5).

Таблица 5. Результаты симуляции введения дисульфидной связи в зоне контакта

МНС1С α ori и МНС1С β ori

МНС1С α ori	МНС1С β ori	Дельта-показатель стабильности (ккал/моль)
R60C	Y26C	1,96
A62C	R12C	-1,62
G63C	Y67C	1,86

1.2.2. Оптимизация изоэлектрической точки

Теоретическая изоэлектрическая точка (pI) элемента МНС-I после введения дисульфидных связей (A62C и R12C в таблице 5) в исходные последовательности составляла 5,80, что не было благоприятным для последующего процесса разработки. Таким образом, авторы настоящего изобретения могли модифицировать соответствующие заряды элемента МНС-I для улучшения возможности получения лекарственного средства. Для элемента МНС-I анализировали доступную для растворителя поверхность (SAS) и заряженные аминокислотные остатки с помощью модуля «Свойства белка» программного обеспечения МОЕ. В элементе МНС-I аминокислотные остатки, характеризующиеся значениями степени экспонирования в растворителе более 40% и демонстрирующие отрицательный заряд/кислотность, показаны в таблице 6. Принимая во внимание структурное окружение, химическое окружение и цели применения соответствующих остатков одновременно один или более таких кислотных аминокислотных остатков заменяли на основной аминокислотный остаток (аргинин (R) или лизин (K)), тем самым обеспечивая увеличение теоретической изоэлектрической точки элемента МНС-I до 6,5-9,0. В конкретном варианте осуществления мутации D22R, E48K и D53K вводили в три сайта в МНС1С α и точечную мутацию E69R вводили в МНС1С β , тем самым обеспечивая увеличение теоретической изоэлектрической точки элемента МНС-I до 7.8.

Таблица 6. Свойства SAS и заряда остатков молекулы в элементе МНС-I

Последовательность	Амин окисл	Положение	Кислот но-осно	Степень экспонирования в	Константа диссоциации

субъединицы	отный остаток		вное свойств	растворителя (%)	кислоты, рКа
МНСIC α ori	ASP	22	Кислотное	85,17	3,19
МНСIC α ori	GLU	48	Кислотное	67,65	3,54
МНСIC α ori	GLU	3	Кислотное	53,81	3,72
МНСIC α ori	GLU	90	Кислотное	51,81	4,78
МНСIC α ori	GLU	101	Кислотное	44,6	2,56
МНСIC α ori	ASP	53	Кислотное	43,3	3,37
МНСIC β ori	GLU	74	Кислотное	67,85	3,91
МНСIC β ori	GLU	47	Кислотное	64,08	3,17
МНСIC β ori	GLU	69	Кислотное	49,51	3,84
МНСIC β ori	ASP	34	Кислотное	48,31	3,1
МНСIC β ori	GLU	16	Кислотное	47,83	3,65
МНСIC β ori	ASP	53	Кислотное	47,27	2,31
МНСIC β ori	GLU	44	Кислотное	44,71	2,32
МНСIC β ori	GLU	50	Кислотное	41,72	3,98
МНСIC β ori	GLU	36	Кислотное	40,96	2,81

1.2.3. Другие оптимизации

Рассматривая 4 аминокислоты (-KWDR) на конце C β -области, их боковые цепи являются относительно длинными, что может обуславливать потенциальные эффекты стерического несоответствия. Стабильность конформации белка будет снижаться, если используется гибкий линкерный пептид G4S. Структурные характеристики глицина (G) и пролина (P) определяют, что эти две аминокислоты расположены главным образом в случайных спиральных или угловых положениях. Глицин не содержит группы боковой цепи, которая способна значительно снижать эффект стерического несоответствия, в то время как боковая цепь пролина представляет собой пятичленную кольцевую структуру и характеризуется определенной жесткостью, что может улучшать стабильность конформации, поэтому в конечном итоге GP добавляли на карбоксильный конец C β -области для компенсации потенциальных эффектов стерического несоответствия и стабильности конформации.

Оптимизированные последовательности элемента МНС-I были следующими:

> C α (SEQ ID NO: 3)

```
GKETLQRADPPKTHVTHNPISRHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDQKDTQ  
KTELVETRPCGDRTFQKWA AVV VPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEPS
```

> C β (SEQ ID NO: 4)

```
IQRTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDL  
SFSKDWSFYLLYYTRFTPTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWDRGP
```

Пример 2. Конструирование и определение характеристик биспецифических антител на основе IgG4 с модифицированным элементом МНС-I

Для того, чтобы убедиться, что элемент МНС-I можно использовать для биспецифических антител, для конструирования биспецифических антител, нацеливающихся на CD3 и CD38, выбирали даратумумаб и антитело SP34, нацеливающееся на CD3 человека, для предварительного подтверждения концепций и изучения эффекта относительных ориентаций C α и C β в

антигенсвязывающих частях с модифицированным элементом МНС-I. Для избегания или снижения ошибочного спаривания между тяжелыми цепями IgG в сконструированные затем биспецифические антитела внедряли структуру «выступы-в-углубления». CH1/CL-домен константной области IgG Fab SP34 заменяли соответствующим C α /C β и C β /C α соответственно для конструирования антигенсвязывающих частей с модифицированным МНС-I с разными относительными ориентациями, и в тяжелую цепь плеча SP34 внедряли структуру «углубление», т.е. CH3-углубление. Fab даратумумаба оставался неизменным, и в его тяжелую цепь внедряли структуру «выступ», т.е. CH3-выступ. Антигенсвязывающие части с модифицированным МНС-I, нацеливающиеся на CD3, объединяли с Fab даратумумаба с получением двух разных биспецифических антител, названных МН1383-1122-IgG4 и МН1383-1133-IgG4 соответственно (молекулярные структуры показаны на фиг. 2), с последовательностями, показанными в таблице 7. В элементах МНС-I использовали C α с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 3, и C β с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 4.

Таблица 7. Последовательности биспецифических антител МН1383-1122-IgG4 и МН1383-1133-IgG4

Название	Состав полипептидных цепей	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
МН1383-1122-IgG4	H1	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7
	L1	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
	H2	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11
	L2	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 13
МН1383-1133-IgG4	H1	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7
	L1	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
	H3	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15
	L3	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17

Для каждого биспецифического антитела для кодирования и получения антитела последовательности ДНК каждой полипептидной цепи вставляли в векторы, соответственно, с получением векторов экспрессии, экспрессирующих

соответствующие полипептидные цепи. 25 мкг векторов экспрессии, кодирующих полипептидные цепи каждого полиспецифического антитела, совместно трансфицировали клетки ExpiCHO-S (изготовитель: Шанхайский институт фармацевтической промышленности, № по кат. 127200005) при объеме векторов экспрессии для трансфекции, составляющем 100 мл, и плотности клеток $6E+06$ клеток/мл.

После трансфекции в клетках обеспечивали экспрессию, и их культивировали при 32°C с 5% CO_2 при 130 об./мин. В день 8 надосадочную жидкость клеток собирали и белок, представляющий собой антитело, очищали за одну стадию с помощью магнитных гранул с белком А (изготовитель: GenScript, № по кат. L00695-20). 4 мл магнитных гранул добавляли в надосадочную жидкость клеток и смесь добавляли в центрифужную пробирку объемом 50 мл. Центрифужную пробирку помещали в ротационный встряхиватель для обесцвечивания (изготовитель: Shanghai ZHICHENG, модель: ZHWY-304) и смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. Магнитные гранулы адсорбировали на дне магнитной подставки, надосадочную жидкость удаляли и магнитные гранулы тщательно промывали буфером. Белки, представляющие собой антитела, элюировали глицином с концентрацией 0,1 моль/л с рН 3,0 (изготовитель: Sinopharm, № по кат. 62011516). Элюат помещали в пробирку для ультрафильтрации (изготовитель: Millipore, № по кат. UFC501096), концентрировали, осуществляли замену буфера на $1\times\text{PBS}$ (изготовитель: Shanghai Sangon, № по кат. B040100-0005) и очищали с получением MHI383-1122-IgG4 и MHI383-1133-IgG4.

2.1. Определение аффинности связывания биспецифических антител с антигенами посредством BLI

Белок CD38 человека (Beijing ACROBiosystems, № по кат. CD8-H5224) и CD3E человека (Beijing ACROBiosystems, № по кат. CDE-H5223) использовали в качестве антигенов. Аффинность MHI383-1122-IgG4 и MHI383-1133-IgG4 к белкам CD38 и CD3E человека по отдельности анализировали посредством методики биослойной интерферометрии (BLI). Конкретные экспериментальные процедуры были следующими.

Для оценки аффинности MHI383-1122-IgG4 и MHI383-1133-IgG4 к белкам

CD38 и CD3E человека использовали анализы аффинности. Анализы аффинности проводили главным образом посредством методики BLI. МНІ383-1122-IgG4 или МНІ383-1133-IgG4 по отдельности подвергали иммобилизации на сенсоре, а затем сенсор погружали в растворы белков CD38 и CD3E человека с определенными градиентами концентрации соответственно. Кривые ассоциации/диссоциации получали в режиме реального времени с помощью Data Acquisition 11.0.0.64 и анализ данных проводили с помощью Data Analysis 11.0. Определяли константу скорости ассоциации, K_a , константу скорости диссоциации, K_d , и константу равновесия, KD , при этом константа равновесия, KD , представляет собой аффинность.

Таблица 8. Аффинность МНІ383-1122-IgG4 и МНІ383-1133-IgG4 (BLI)

Образец	Антиген	Константа ассоциации (1/М с)	Константа диссоциации (1/с)	KD (М)	Антиген	Константа ассоциации (1/М с)	Константа диссоциации (1/с)	KD (М)
МНІ383-1122-IgG4	CD3E человека	2,05E+05	2,46E-04	1,20E-09	CD38 человека	2,17E+05	3,69E-03	1,70E-08
МНІ383-1133-IgG4	CD3E человека	1,43E+05	9,17E-05	6,41E-10	CD38 человека	2,94E+05	1,80E-03	6,14E-09

Экспериментальные результаты демонстрировали, что оба биспецифических антитела МНІ383-1122-IgG4 и МНІ383-1133-IgG4 с разными ориентациями $C\alpha/C\beta$ демонстрировали хорошую аффинность к белкам CD38 и CD3E человека, и их значения аффинности, KD , отличались менее чем в 3 раза, что было обусловлено главным образом потерей в их константах скорости диссоциации, K_d (таблица 8). Таким образом, элементы МНС-I ($C\alpha$ и $C\beta$) могут заменять СН1- и СL-домены для конструирования биспецифических антител.

Пример 3. Конструирование и определение характеристик биспецифических антител на основе IgG1 с модифицированным элементом

МНС-I

Для избегания или снижения ошибочного спаривания между тяжелыми цепями IgG в сконструированные биспецифические антитела внедряли структуру «выступы-в-углубления». Для тестирования влияния элементов МНС-I (Ca с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 3, и Cβ с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 4) в отношении биспецифических антител разных подтипов IgG, авторы настоящего изобретения конструировали МН1383-1122-IgG4, описанный выше, в форме IgG1, с получением нового биспецифического антитела, названного МН1383-ccff-IgG1 (структура конструкции является такой, как показано на фиг. 3). В CH2-домены двух тяжелых цепей данного антитела внедряли двойную мутацию LALA (L234A + L235A) для устранения потенциального эффекторного эффекта Fc. В данном примере вводили двойную мутацию H435R + Y436F (нумерация EU) в CH3-домен тяжелой цепи с модифицированным элементом МНС-I. Продукт с ошибочно спаренными тяжелыми цепями, содержащий двойную мутацию H435R + Y436F, не объединяли с белком А, так что продукт с ошибочно спаренными тяжелыми цепями удаляли при очистке посредством аффинной хроматографии с белком А, улучшая таким образом чистоту и эффективность очистки биспецифического антитела, представляющего интерес.

МН1383-ccff-IgG1 содержит четыре полипептидные цепи (Hc, Lc, Hf и Lf) со следующими последовательностями:

Hc: аминокислотная последовательность представлена под SEQ ID NO: 18, и нуклеотидная последовательность представлена под SEQ ID NO: 19;

Lc: аминокислотная последовательность представлена под SEQ ID NO: 20, и нуклеотидная последовательность представлена под SEQ ID NO: 21;

Hf: аминокислотная последовательность представлена под SEQ ID NO: 22, и нуклеотидная последовательность представлена под SEQ ID NO: 23, и

Lf: аминокислотная последовательность представлена под SEQ ID NO: 24, и нуклеотидная последовательность представлена под SEQ ID NO: 25.

Элюированный белок с целевым пиком дополнительно очищали посредством

препаративной эксклюзионной хроматографии с применением колонки Superdex™ 200 Increase 10/300GL и системы АКТА от GE. Эксперимент с очисткой проводили с применением уравнивающего буфера (50 мМ Tris-HAc, 150 мМ L-Arg-HCl, pH 7,5) при расходе 0,8 мл/мин. Фиг. 4 представляет собой график очистки молекулы MНI383-ccff-IgG1 посредством SEC. Продукт с основным пиком при SEC (время удерживания RT = 7,174 мин) собирали для последующего масс-спектрометрического анализа. Идентификацию полной молекулярной массы проводили в отношении продукта с основным пиком при SEC, описанным выше, посредством жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией.

Анализ полной молекулярной массы проводили с применением системы для LC-MS Waters (Waters, Сингапур, США, Великобритания). Применяли хроматографическую колонку MAbPac RP, 4 мкм, 2,1 × 50 мм (Thermo, США). В качестве подвижных фаз использовали фазу А (0,1% водный раствор муравьиной кислоты) и фазу В (0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле), и длина волны для выявления составляла 280 нм. 1 мкг белка вводили в систему для жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией с градиентом от 5% В до 100% В за 5,5 мин. Масс-спектрометр применяли в режиме положительных ионов, и диапазон сканирования составлял 200-4000 масса/заряд. Данные собирали с применением MassLynx 4.1 и обрабатывали с помощью UNIFI 1.8.2.169. Результаты масс-спектрометрии демонстрировали, что пик при 149934 Да (фиг. 5) соответствовал ожидаемой полной молекулярной массе правильно собранного биспецифического антитела MНI383-ccff-IgG1.

На основе анализа профиля последовательностей аминокислотных последовательностей элементов МНС-I авторы настоящего изобретения не обнаружили мотивов сайтов N-связанного гликозилирования (NXS/T, X = любая аминокислота, отличная от пролина). Однако сайты O-связанного гликозилирования было сложно предсказать на основе последовательностей. Таким образом, N-гликан, присутствующий в белке с основным пиком при SEC, описанном выше, дополнительно расщепляли посредством гидролиза с применением гликозидазы PNGазы-F. Характеристики белка после отщепления N-гликана определяли посредством пептидного картирования (секвенирования

белка) посредством тандемной масс-спектрометрии для изучения возможного присутствия сайтов O-гликозилирования.

Анализ покрытия пептидных последовательностей проводили с применением системы для LC-MS Waters (Waters, Сингапур, США, Великобритания). Применяли хроматографическую колонку AdvanceBio Peptide Map, 2,1 × 150 мм, 2,7 микрон (Agilent, США). В качестве подвижных фаз использовали фазу А (0,1% водный раствор муравьиной кислоты) и фазу В (0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле), и длина волны для выявления составляла 214 нм. Белок после обработки PNGазой F денатурировали, восстанавливали и алкилировали, а затем белок расщепляли трипсином в течение ночи. Подходящее количество белка после расщепления вводили систему для жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии для выявления. Градиент элюирования был следующим: от 0% В до 15% В за 13 мин и от 15% В до 40% В за 45 мин. Масс-спектрометр применяли в режиме положительных ионов, и диапазон сканирования составлял 100-2000 масса/заряд. Данные собирали с применением MassLynx 4.1 и обрабатывали с помощью UNIFI 1.8.2.169.

Результаты эксперимента с пептидным картированием также демонстрировали, что модификация, представляющая собой O-связанное гликозилирование, в молекуле MHI383-ccff-IgG1 отсутствовала, что указывает на то, что в элементе MHC-I также отсутствовал сайт O-связанного гликозилирования. По сравнению с биспецифическим антителом на основе модификации TCR биспецифические антитела с модифицированным элементом MHC-I характеризуются более низким уровнем гетерогенности гликоформ и являются более предпочтительными для последующей технологической разработки и контроля качества.

Пример 4. Моделирование сайтов мутаций и проверка ошибочного спаривания цепей

Антитело HZ5G11 нацеливается на внеклеточный домен белка PD-L1 человека, а антитело HZ14A9 нацеливается на внеклеточный домен белка CD47 человека. Оба антитела являются моноклональными антителами, полученными посредством скрининга гибридом и проведения гуманизации после

иммунизации мышей соответствующими антигенами.

Моноклональное антитело IgG1K HZ5G11, нацеливающееся на PD-L1 человека, состоит из тяжелой цепи HZ5G11VH-CH1-IgG1 (с аминокислотной последовательностью тяжелой цепи, представленной под SEQ ID NO: 26, и нуклеотидной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 27) и легкой цепи HZ5G11VL-IgK (с аминокислотной последовательностью легкой цепи, представленной под SEQ ID NO: 28, и нуклеотидной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 29). Моноклональное антитело IgG1K HZ14A9, нацеливающееся на CD47 человека, состоит из тяжелой цепи HZ14A9VH-CH1-IgG1 (с аминокислотной последовательностью тяжелой цепи, представленной под SEQ ID NO: 45) и легкой цепи HZ14A9VL-IgK (с аминокислотной последовательностью легкой цепи, представленной под SEQ ID NO: 46). Родственные HZ14A9 и HZ5G11 варианты на основе элементов МНС-I дополнительно конструировали следующим образом: CH1-домен константной области IgG1 тяжелой цепи антитела HZ14A9 заменяли на МНСI α (SEQ ID NO: 3) в соответствующем элементе МНС-I с получением тяжелой цепи HZ14A9VH-C α -IgG1 (с аминокислотной последовательностью тяжелой цепи, представленной под SEQ ID NO: 47), а CL-домен константной области IgK легкой цепи антитела HZ14A9 заменяли на МНСI β (SEQ ID NO: 4) в соответствующем элементе МНС-I с получением легкой цепи HZ14A9VL-C β (с аминокислотной последовательностью легкой цепи, представленной под SEQ ID NO: 48); CH1-домен константной области IgG1 тяжелой цепи антитела HZ5G11 заменяли на МНСI α в соответствующем элементе МНС-I с получением тяжелой цепи HZ5G11VH-C α -IgG1 (с аминокислотной последовательностью тяжелой цепи, представленной под SEQ ID NO: 30, и нуклеотидной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 31), а CL-домен константной области IgK легкой цепи антитела HZ5G11 заменяли на МНСI β в соответствующем элементе константной области МНС-I с получением легкой цепи HZ5G11VL-C β (с аминокислотной последовательностью легкой цепи, представленной под SEQ ID NO: 32, и нуклеотидной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 33).

Для подтверждения того, было ли возможным взаимодействие между

элементами МНС-I МНСI α и МНСI β с константной областью СН1 и константной областью СL легкой цепи антитела, по отдельности конструировали плазмиды, кодирующие разные тяжелые цепи или легкие цепи, объединяли, а затем очищали для экспрессии в парах, как показано в таблице 9. В частности синтезировали последовательности ДНК и последовательности ДНК, кодирующие тяжелую цепь и легкую цепь, вставляли в векторы (например, вектор pсDNA3.1, раскрытый в CN107001463A, вектор рCHO1.0, раскрытый в CN109422811A, и т.п.) соответственно с получением рекомбинантных векторов экспрессии, экспрессирующих соответствующую тяжелую цепь или легкую цепь. В соответствии с массовым соотношением 1:1 рекомбинантными векторами экспрессии, экспрессирующими тяжелую цепь и легкую цепь, совместно трансфицировали клетки ExpiCHO-S (изготовитель: Шанхайский институт фармацевтической промышленности, № по кат. 127200005) при объеме векторов экспрессии для трансфекции, составляющем 0,1-1 л, и плотности клеток 6E+06 клеток/мл.

После трансфекции клетки помещали в среду ExpiCHO™ (изготовитель: Thermo, № по кат. A2910001), и в клетках обеспечивали экспрессию, и их культивировали при 32°C с 5% CO₂ при 130 об./мин. В день 10 надосадочную жидкость клеток собирали и целевой белок очищали посредством аффинной хроматографии с белком А с применением системы АКТА Pure на 25 л от GE и носителя MabSelect SuRe LX. После элюирования концентрацию элюированного белка измеряли с применением NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific). Чистоту элюированного белка измеряли посредством ВТОР-НPLC, и чистота белка в образце, используемом для теста, составляла не меньше 80%. Общее количество, составляющее 5 мг белка, отбирали из каждого образца и подвергали электрофорезу SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях. Белок окрашивали с помощью кумасси бриллиантового синего и наблюдали результаты электрофореза.

Таблица 9. Комбинации экспрессии разных тяжелых цепей/легких цепей в парах

Комбинация	Тяжелая цепь	Легкая цепь
1	HZ5G11VH-CH1-Ig	HZ5G11VL-I

	G1	gK
2	HZ14A9VH-CH1-Ig G1	HZ14A9VL-I gK
3	HZ5G11VH-CH1-Ig G1	HZ14A9VL-I gK
4	HZ14A9VH-CH1-Ig G1	HZ5G11VL-I gK
5	HZ5G11VH-C α -IgG 1	HZ14A9VL-I gK
6	HZ14A9VH-CH1-Ig G1	HZ5G11VL-C β
7	HZ14A9VH-C α -IgG 1	HZ5G11VL-I gK
8	HZ5G11VH-CH1-Ig G1	HZ14A9VL-C β

Как показано на фиг. 6, результаты эксперимента демонстрировали, что гибридные спаренные продукты все еще образовывались за счет обмена легкими и тяжелыми цепями между моноклональными антителами HZ5G11 и HZ14A9 соответственно, и значения молекулярной массы гибридных спаренных продуктов представляли собой таковые в диапазоне между моноклональными антителами HZ5G11 и HZ14A9. После совместной экспрессии и очистки образовывались различные продукты, HZ5G11VH-C α -IgG1 и HZ14A9VL-IgK, а также HZ14A9VH-C α -IgG1 и HZ5G11VL-IgK. Среди них комбинация HZ5G11VH-C α -IgG1 и HZ14A9VL-IgK демонстрировала, что молекулярная масса гибридного спаренного продукта составляла 130-180 кДа, что было близко к таковой моноклональных антител HZ5G11 и HZ14A9. В то же время комбинация HZ14A9VH-C α -IgG1 и HZ5G11VL-IgK демонстрировала, что молекулярная масса гибридного спаренного продукта составляла 100-130 кДа, что сильнее отличалось от таковой моноклональных антител HZ5G11 и HZ14A9. Результаты выше указывают на то, что имеет место некоторое взаимодействие между CL-доменом и MHC1 α , что приводит к образованию продуктов с ошибочно спаренными легкими и тяжелыми цепями. После совместной

экспрессии и очистки HZ14A9VH-CH1-IgG1 и HZ5G11VL-C β , а также HZ5G11VH-CH1-IgG1 и HZ14A9VL-C β не наблюдалось значительных полос на дорожках соответствующего SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях, то есть не образовывалось значительное количество гибридных спаренных продуктов, указывая на то, что значительное взаимодействие между CH1-доменом и MHCIC β отсутствовало.

Для решения проблемы ошибочного спаривания между тяжелой цепью, содержащей MHCIC α , и легкой цепью, содержащей CL-домен, проводили структурный анализ зоны контакта доменов MHCIC α (SEQ ID NO: 3)/MHCIC β (SEQ ID NO: 4) и константной области CH1 IgG1 (SEQ ID NO: 34)/константной области CL IgK (SEQ ID NO: 35). В комбинации с анализом последовательностей авторы настоящего изобретения считают, что участки 114 (нумерация EU), 116 (нумерация EU) и 118 (нумерация EU) в CL-доме могут участвовать в процессе взаимного обмена MHCIC β и CL-доменом при последующей сборке биспецифических антител, тем самым приводя к образованию ошибочно спаренного продукта со взаимным обменом. Для проверки влияния точечных мутаций в S114 (нумерация EU), F116 (нумерация EU) и F118 (нумерация EU) в CL-доме константной области IgK на процесс спаривания MHCIC α и CL-домена неароматические гидрофобные аминокислоты (M: метионин, A: аланин, V: валин, I: изолейцин или L: лейцин) вводили в участки S114 (нумерация EU), F116 (нумерация EU) или F118 (нумерация EU) в CL-доме легкой цепи HZ5G11VL-IgK соответственно и обеспечивали экспрессию в комбинации с тяжелой цепью HZ14A9VH-C α -IgG1. Информация о последовательностях нескольких легких цепей сконструированных антител, содержащих мутации, показана в таблице 10, и несколько комбинаций экспрессии разных тяжелых цепей/легких цепей в парах показаны в таблице 11.

Таблица 10. Информация о последовательностях нескольких легких цепей сконструированных антител, содержащих мутации

Плазмида	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
		ть

HZ5G11VL-IgK-S114A	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 37
HZ5G11VL-IgK-F116A	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 39
HZ5G11VL-IgK-F118A	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 41
HZ5G11VL-IgK-F118I	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 43

Таблица 11. Несколько комбинаций экспрессии разных тяжелых цепей/легких цепей в парах

Комбинация	Легкая цепь	Тяжелая цепь
1	HZ5G11VL-IgK	HZ14A9VH-C α -IgG1
2	HZ5G11VL-IgK-S114A	HZ14A9VH-C α -IgG1
3	HZ5G11VL-IgK-F116A	HZ14A9VH-C α -IgG1
4	HZ5G11VL-IgK-F118I	HZ14A9VH-C α -IgG1
5	HZ5G11VL-IgK-F118A	HZ14A9VH-C α -IgG1

В случае разработки биспецифических антител ошибочно спаренный продукт с молекулярной массой более 100 кДа не может быть эффективно отделен от продукта, представляющего интерес, или может повысить сложность разделения, тем самым влияя на качество продукта на основе биспецифического антитела. Результаты демонстрировали, что спаренная комбинация HZ5G11VL-IgK-F118A и HZ14A9VH-C α -IgG1 может значительно снизить частоту образования спаренного продукта с молекулярной массой более 100 кДа (фиг. 7), указывая на то, что точечная мутация F118A способна снижать силу взаимодействия между MHC1 α и CL-доменом, так что проблема существования процесса взаимного обмена MHC1 β и CL-доменами при последующей сборке биспецифических антител дополнительно разрешается или облегчается, тем самым обеспечивая улучшение качества продукта на основе биспецифического антитела.

Пример 5. Влияние мутации F118A в CL-домене на сборку моноклональных антител

Для проверки влияния точечной мутации F118A (нумерация EU) в CL-домене константной области IgK на сборку моноклонального антитела точечную мутацию F118A отдельно вводили в константные области IgK легкой цепи моноклональных антител, нацеливающихся на CD47 и PD-L1 (HZ14A9 и HZ5G11), и обеспечивали экспрессию мутированных легких цепей в парах с их изначальными тяжелыми цепями соответственно с получением HZ14A9-F118A и HZ5G11-F118A. В то же время обеспечивали экспрессию моноклональных антител дикого типа, нацеливающихся на CD47 и PD-L1 (HZ14A9 и HZ5G11), в качестве контрольных образцов соответственно. Способы конструирования и экспрессии антител см. в примере 4.

Как показано на фиг. 11, результаты экспериментов с SDS-PAGE в невозстанавливающих условиях демонстрировали, что полосы всех протестированных образцов располагались около 150 кДа. Это указывает на то, что точечная мутация F118A (нумерация EU) в CL-домене константной области IgK не влияет на сборку моноклональных антител.

Пример 6. Конструирование и определение характеристик эффективности биспецифических антител к PDL1*CD47

5.1. Конструирование и экспрессия

Для проверки влияния точечной мутации F118A (нумерация EU) в CL-домене константной области IgK на биспецифические антитела конструировали два биспецифических антитела, нацеливающихся на CD47 и PD-L1, в которых антигенсвязывающая часть, нацеливаемая на PD-L1, представляла собой антигенсвязывающую часть с модифицированным элементом MHC-I, CH1/CL антитела HZ5G11 был заменен на MHC1 α /MHC1 β , и антигенсвязывающая часть, нацеливаемая на CD47, представляла собой Fab. В результате конструирования антитела HZ14A9 CL-домен константной области легкой цепи Fab был без мутации в участке F118 (нумерация EU) и нес точечную мутацию F118A. В CH2-домены двух тяжелых цепей обоих антител внедрили двойную мутацию LALA (L234A + L235A) для устранения потенциального эффекторного

эффекта Fc. СH3-домен нес мутацию КИH для стимуляции образования гетеродимера. Таким образом, было получено два биспецифических антитела, нацеливающихся на CD47 и PD-L1, в одно и то же время, которые представляли собой MHL147-3322-IgG1-wt (молекулярные структуры показаны на фиг. 8) и MHL147-3322-IgG1-F118A (молекулярные структуры показаны на фиг. 9) соответственно.

Таблица 12. Последовательности биспецифических антител к PDL1*CD47

Название антитела	Полипептидная цепь	Аминокислотная последовательность
MHL147-3322-IgG1-wt	H2	(SEQ ID NO: 49)
	L2	(SEQ ID NO: 50)
	H3	(SEQ ID NO: 51)
	L3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASENVVSY VSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRYTGVP SRFIG SGSSTDFLTISLQPEDFATYYCGQSYSYPLTF GQGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 53)
MHL147-3322-F118A	H2	QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTVSGFSLSTYG VHWIRQPPGKALEWLGVIWRGVTTDYNAAF MSRLTITKDNSKNQVVTMNNMDPVDATYY CARLGFYAMDYWGQGLVTVSS GKETLQRADPPKTHVTHHPISRHEATLRCWAL GFYPAEITLTWQRDQKQKTELVEPTRPCGD RTFQKWA AVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKP LTLRWEPS EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH

		<p>QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKT QPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKTFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNRF QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 49)</p>
	L2	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSND VAWYQQKPGKAPKLLIYYAANRYTGVPDRFS GSGYGTDFFTISLQPEDATYFCQQDYTSFY TFGQGTKLEIK IQRTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSGFHPS DIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWFSYLL YYTRFTPEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWD RGP (SEQ ID NO: 50)</p>
	H3	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGFNIED DYIEWVRQAPGQGLEWMGRIDPANDKTKYA QKFQGRVTMTGDTSTNTVYMELSSLRSEDTA VYYCARPGLRRYYSM DYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 51)</p>
	L3	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASENVVSY VSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRYTGVPSTRFIG</p>

		SGSSTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQSYSYPLTF GQGTKLEIK RTVAAPSVFIAPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 52)
--	--	--

Последовательности ДНК, кодирующие и составляющие каждую полипептидную цепь, вставляли в векторы (например, вектор pcDNA3.1, раскрытый в CN107001463A, вектор pCHO1.0, раскрытый в CN109422811A, и т. п.) соответственно с получением векторов экспрессии, экспрессирующих соответствующую полипептидную цепь. В соответствии с массовым соотношением в равной пропорции векторами экспрессии, кодирующими каждую полипептидную цепь, совместно трансфицировали клетки ExpiCHO-S (изготовитель: Шанхайский институт фармацевтической промышленности, № по кат. 127200005) при объеме векторов экспрессии для трансфекции, составляющем 0,1-1 л, и плотности клеток $6E+06$ клеток/мл. После трансфекции клетки помещали в среду ExpiCHO™ (изготовитель: Thermo, № по кат. A2910001), и в клетках обеспечивали экспрессию, и их культивировали при 32°C с 5% CO₂ при 130 об./мин. В день 10 надосадочную жидкость клеток собирали и проводили аффинную хроматографию с белком А в отношении целевого белка с применением системы АКТА Pure на 25 л от GE и носителя MabSelect SuRe LX. После элюирования концентрацию элюированного белка измеряли с применением NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific). Чистоту элюированного белка измеряли посредством SEC-HPLC.

Таблица 12. Количество и чистота биспецифических антител к PDL1*CD47 после экспрессии

Образец	Способ очистки	Количество после экспрессии (мг/л)	Чистота по результатам HPLC-SEC (%)
MHL147-3322-IgG1-wt	Аффинная	22	82,94

	хроматография с белком А		
MHL147-3322-IgG1-F118A	Аффинная хроматография с белком А	38	92,85

Результаты очистки посредством одностадийной аффинной хроматографии с белком А демонстрировали, что количество и чистота MHL147-3322-IgG1-F118A после экспрессии были выше, чем таковые в случае MHL147-3322-IgG1-wt (таблица 12), и точечная мутация F118A (нумерация EU) в CL-домене может улучшать процесс сборки и спаривания биспецифического антитела в клетках и снижать частоту образования ошибочно спаренных продуктов, тем самым обеспечивая улучшение количества и чистоты биспецифического антитела после экспрессии.

5.2. Термическая стабильность

Определение характеристик термической стабильности HZ14A9, HZ5G11, MHL147-3322-IgG1-wt и MHL147-3322-IgG1-F118A осуществляли посредством нано-DSF (Nano Temper). Концентрацию образца, подлежащего тестированию, доводили до приблизительно 1,0 мг/мл, затем небольшое количество образца вытягивали с применением капилляра из диоксида кремния и помещали в суспензию образцов для нано-DSF. Температуру повышали до температуры в диапазоне от 20,0°C до 95,0°C с постоянной скоростью 1,0°C/мин. Определяли изменение оптического сигнала образца белка и анализировали термическую стабильность белка.

Таблица 13. Термическая стабильность биспецифических антител к PDL1*CD47

Образец	Температура плавления, T _{m1} (°C)
MHL147-3322-IgG1-wt	66,4
MHL147-3322-IgG1-F118A	67
HZ14A9	68,3
HZ5G11	67

Результаты эксперимента с нано-DSF демонстрировали, что все из HZ14A9,

HZ5G11, MHL147-3322-IgG1-wt и MHL147-3322-IgG1-F118A характеризовались хорошей термической стабильностью, и температура плавления T_m всех образцов была выше 65°C (таблица 13). Точечная мутация F118A (нумерация EU) в CL-домене не оказывала значительного влияния на термическую стабильность биспецифических антител.

5.3. Аффинность

Определение характеристик свойств аффинности моноклонального антитела HZ5G11, моноклонального антитела HZ14A9, биспецифических антител MHL147-3322-IgG1-wt и MHL147-3322-IgG1-F118A осуществляли посредством Biacore. Моноклональное антитело HZ5G11, моноклональное антитело HZ14A9, биспецифические антитела MHL147-3322-IgG1-wt и MHL147-3322-IgG1-F118A соответственно подвергали иммобилизации на чувствительном чипе посредством способа захвата, и раствор белкового антигена PDL1 человека (изготовитель: ACROBiosystems, № по кат. PD1-H52H3) или CD47 человека (изготовитель: ACROBiosystems, № по кат. CD7-H5227) с определенным градиентом концентрации вводили в образец. Кривые ассоциации/диссоциации получали в режиме реального времени с помощью Biacore 8K Control Software 3.0 и анализ данных проводили с помощью Biacore Insight Evaluation Software 3.0. Определяли константу скорости ассоциации, k_a , константу скорости диссоциации, k_d , и константу равновесия, KD .

Таблица 14. Аффинность связывания биспецифических антител к PDL1*CD47 с антигеном CD47 человека

Образец	k_a (1/M c)	k_d (1/c)	KD (M)
Моноклональное антитело HZ14A9	2,45E+06	1,43E-02	5,85E-09
MHL147-3322-IgG1-F118A	4,74E+06	2,49E-02	5,26E-09
MHL147-3322-IgG1-wt	3,75E+06	1,24E-02	3,31E-09

Таблица 15. Аффинность связывания биспецифических антител к PDL1*CD47 с антигеном PDL1 человека

Образец	ka (1/M c)	kd (1/c)	KD (M)
Моноклональное антитело HZ5G11	1,51E+06	4,27E-04	2,82E-10
MHL147-3322-IgG1-F118A	1,58E+06	6,06E-04	3,84E-10
MHL147-3322-IgG1-wt	1,85E+06	5,62E-04	3,04E-10

Результаты эксперимента демонстрировали, что оба биспецифических антитела MHL147-3322-IgG1-wt и MHL147-3322-IgG1-F118A демонстрировали хорошую аффинность к белкам PDL1 и CD47 человека (таблица 15 и таблица 16).

5.4. Эксперимент с агглютинацией эритроцитов

Определение характеристик потенциальных свойств безопасности MHL147-3322-IgG1-wt и MHL147-3322-IgG1-F118A в крови осуществляли посредством экспериментов с агглютинацией эритроцитов человека. Эритроциты тщательно промывали с удалением плазмы крови, прикрепленной к поверхности мембраны эритроцита. Эритроциты 3 раза промывали изотоническим разбавителем, центрифугировали при 2000 об./мин в течение 5 мин первые 2 раза и центрифугировали при 2000 об./мин в течение 10 мин в последний раз. Надосадочную жидкость затем удаляли. Эритроциты получали в виде 2% суспензии клеток в PBS. 100 мкл суспензии пипеткой переносили в 96-луночный U-образный планшет, планшет центрифугировали при 1500 об./мин в течение 5 мин и надосадочную жидкость удаляли. MHL147-3322-IgG1-wt, MHL147-3322-IgG1-F118A и изотипический контрольный образец hIgG1 доводили до получения градиента 8 концентраций (0, 0,1, 0,2, 0,7, 2, 6, 17 и 50 мкг/мл), разбавитель для антител добавляли в 96-луночный U-образный планшет, и общий объем реакционной смеси составлял 100 мкл. Смесь ресуспендировали и хорошо перемешивали, а затем планшет оставляли отстаиваться в инкубаторе при 37°C в течение 2 ч. Результаты наблюдали после инкубации в течение 2 ч. Как показано на фиг. 10, MHL147-3322-IgG1-F118A демонстрировал более слабую способность вызывать агглютинацию эритроцитов, чем MHL147-3322-IgG1-wt при концентрации биспецифического антитела ≥ 2 мкг/мл, что свидетельствует о

том, что мутация F118A (нумерация EU) в CL-домене константной области IgK может эффективно снижать частоту образования ошибочно спаренных продуктов и обеспечивать улучшение однородности биспецифических антител.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическое антитело, содержащее первую антигенсвязывающую часть и вторую антигенсвязывающую часть, которое специфически связывается с двумя разными антигенами или разными эпитопами одного и того же антигена, где первая антигенсвязывающая часть содержит:

первый полипептид, содержащий от N-конца к С-концу: первый переменный домен тяжелой цепи и первый спаренный домен, функционально связанный с первым переменным доменом тяжелой цепи, и

второй полипептид, содержащий от N-конца к С-концу: первый переменный домен легкой цепи и второй спаренный домен, функционально связанный с первым переменным доменом легкой цепи,

где один из первого спаренного домена и второго спаренного домена содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\alpha 3$ HLA-I, а другой спаренный домен содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\beta 2$ -микροглобулина.

2. Биспецифическое антитело по п. 1, где первый спаренный домен и второй спаренный домен способны образовывать димер, возможно образование по меньшей мере одной неприродной межцепочечной связи между первым спаренным доменом и вторым спаренным доменом, и при этом неприродная межцепочечная связь способна стабилизировать димер.

3. Биспецифическое антитело по п. 1 или п. 2, где первый спаренный домен содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\alpha 3$ HLA-I, и второй спаренный домен содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\beta 2$ -микροглобулина, или

первый спаренный домен содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\beta 2$ -микροглобулина, и второй спаренный домен содержит аминокислотную последовательность сконструированного $\alpha 3$ HLA-I.

4. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-3, где аминокислотная последовательность сконструированного $\alpha 3$ HLA-I характеризуется по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 1, и

аминокислотная последовательность сконструированного β 2-микроглобулина характеризуется по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 2.

5. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-4, где сконструированный α 3 HLA-I содержит аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную замену в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1, и сконструированный β 2-микроглобулин содержит аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную замену в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 2.

6. Биспецифическое антитело по п. 5, где аминокислотные замены как в сконструированном α 3 HLA-I, так и в сконструированном β 2-микроглобулине предусматривают замены на остаток цистеина, которые происходят в зоне контакта между ними двумя и способны образовывать дисульфидную связь друг с другом;

при этом замена на остаток цистеина выбрана из одной или более пар в следующей группе:

- (1) R60C в SEQ ID NO: 1 и Y26C в SEQ ID NO: 2;
- (2) A62C в SEQ ID NO: 1 и R12C в SEQ ID NO: 2 и
- (3) G63C в SEQ ID NO: 1 и Y67C в SEQ ID NO: 2.

7. Биспецифическое антитело по любому из пп. 5-6, где аминокислотные замены в сконструированном α 3 HLA-I и/или сконструированном β 2-микроглобулине предусматривают аминокислотные замены, которые увеличивают изоэлектрическую точку димера, образованного спаренными доменами, или биспецифического антитела,

где аминокислотные замены, которые увеличивают изоэлектрическую точку, предусматривают замену в сконструированном α 3 HLA-I на положительно заряженную аминокислоту в одном или более положениях из E3, D22, E48, D53, E90 и E101 в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1, и/или

аминокислотные замены, которые увеличивают изоэлектрическую точку, предусматривают замену в сконструированном β 2-микроглобулине на положительно заряженную аминокислоту в одном или более положениях из E74, E47, E69, D34, E16, D53, E44, E50 и E36 в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 2;

предпочтительно

аминокислотные замены, которые увеличивают изоэлектрическую точку, предусматривают аминокислотные замены D22R, E48K и D53K, содержащиеся в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1, в случае сконструированного $\alpha 3$ HLA-I, и аминокислотную замену E69R, содержащуюся в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 2, в случае сконструированного $\beta 2$ -микроглобулина.

8. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-7, где сконструированный $\alpha 3$ HLA-I содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3, и сконструированный $\beta 2$ -микроглобулин содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4, или

сконструированный $\alpha 3$ HLA-I содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3, и сконструированный $\beta 2$ -микроглобулин содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5.

9. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-8, где вторая антигенсвязывающая часть содержит Fab; предпочтительно

аминокислота в CL-домене Fab заменена на аланин в положении F118 в соответствии с нумерацией EU.

10. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-8, где биспецифическое антитело является бивалентным.

11. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-8, дополнительно содержащее третью антигенсвязывающую часть, где третья антигенсвязывающая часть связывается с тем же эпитопом антигена, что и вторая антигенсвязывающая часть, или

третья антигенсвязывающая часть связывается с тем же эпитопом антигена, что и первая антигенсвязывающая часть.

12. Биспецифическое антитело по п. 10, где биспецифическое антитело является тривалентным.

13. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-10, дополнительно содержащее Fc-домен, состоящий из двух Fc-полипептидов, способных к стабильной ассоциации.

14. Биспецифическое антитело по п. 13, где первая антигенсвязывающая часть функционально связана на своем С-конце с N-концом одного из Fc-полипептидов, и вторая антигенсвязывающая часть функционально связана на своем С-конце с N-концом другого Fc-полипептида, или

первый полипептид первой антигенсвязывающей части функционально связан на своем С-конце с N-концом одного из Fc-полипептидов, и вторая антигенсвязывающая часть содержит Fab, и тяжелая цепь Fab второй антигенсвязывающей части функционально связана на своем С-конце с N-концом другого Fc-полипептида.

15. Биспецифическое антитело по любому из пп. 11-12, дополнительно содержащее Fc-домен, состоящий из двух Fc-полипептидов, способных к стабильной ассоциации.

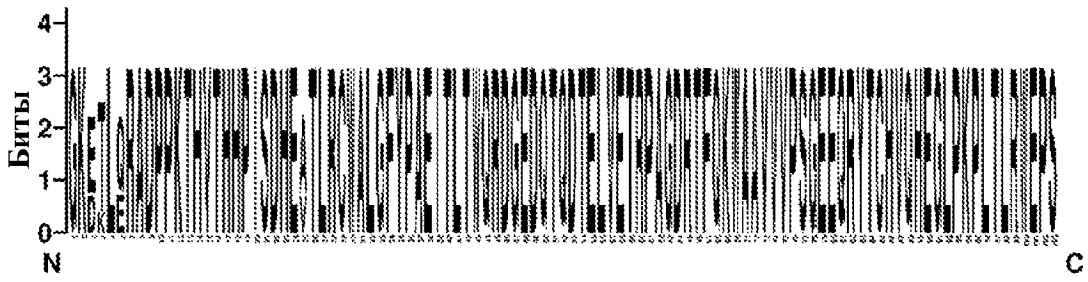
16. Биспецифическое антитело по п. 15, где первая антигенсвязывающая часть функционально связана на своем С-конце с N-концом одного из Fc-полипептидов, вторая антигенсвязывающая часть функционально связана на своем С-конце с N-концом другого Fc-полипептида, и третья антигенсвязывающая часть функционально связана на своем С-конце с N-концом первой антигенсвязывающей части или N-концом второй антигенсвязывающей части, или

третья антигенсвязывающая часть функционально связана на своем С-конце с N-концом одного из Fc-полипептидов, первая антигенсвязывающая часть функционально связана на своем С-конце с N-концом третьей антигенсвязывающей части, и вторая антигенсвязывающая часть функционально связана на своем С-конце с N-концом другого Fc-полипептида, или

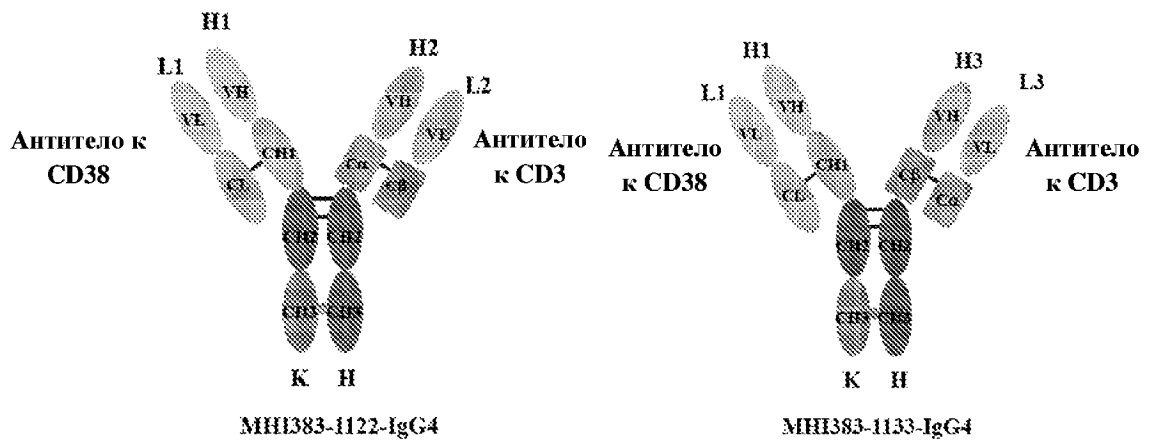
третья антигенсвязывающая часть функционально связана на своем С-конце с N-концом одного из Fc-полипептидов, вторая антигенсвязывающая часть функционально связана на своем С-конце с N-концом третьей антигенсвязывающей части, и первая антигенсвязывающая часть функционально связана на своем С-конце с N-концом другого Fc-полипептида.

17. Способ лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества биспецифического антитела по любому из пп. 1-16, где заболевание предпочтительно включает лейкоз, лимфому, миелому, рак яичника, рак молочной железы, рак эндометрия, рак толстой

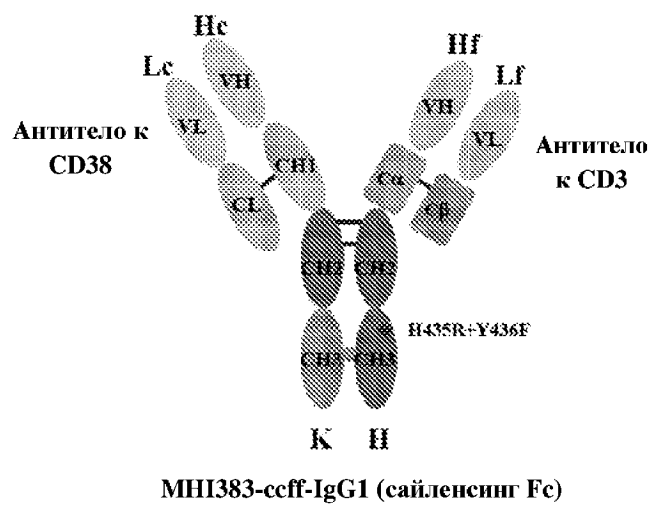
кишки, ректальный рак, рак почки, рак мочевого пузыря, уротелиальный рак, рак легкого, бронхиальный рак, рак кости, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак желудка, гепатоцеллюлярную карциному, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, рак пищевода, почечноклеточный рак, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак яичка, эндокринную аденокарциному, рак надпочечника, рак гипофиза, рак кожи, рак мягких тканей, рак сосудистой системы, рак головного мозга, рак нервной системы, рак глаза, рак мозговой оболочки, рак ротоглотки, рак гортаноглотки, рак шейки матки, рак матки, глиобластому, медуллобластому, астроцитому, глиому, менингиому, гастриному, нейробластому, меланому, миелодиспластический синдром или саркому.



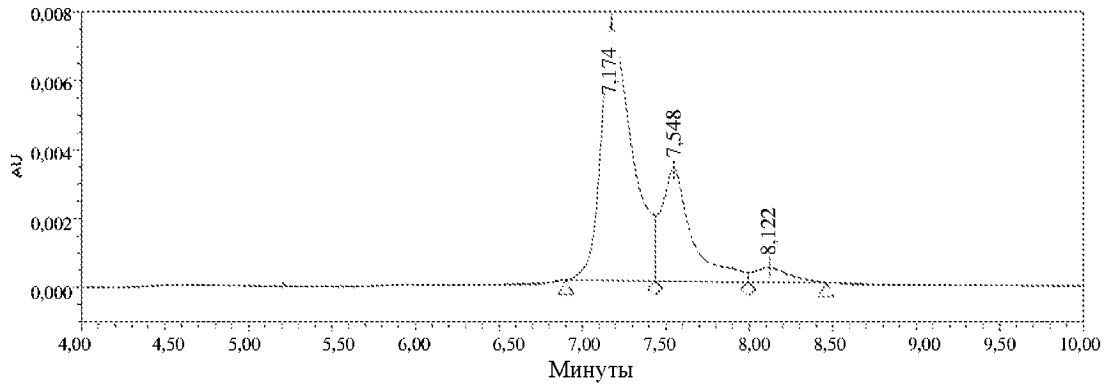
Фиг. 1



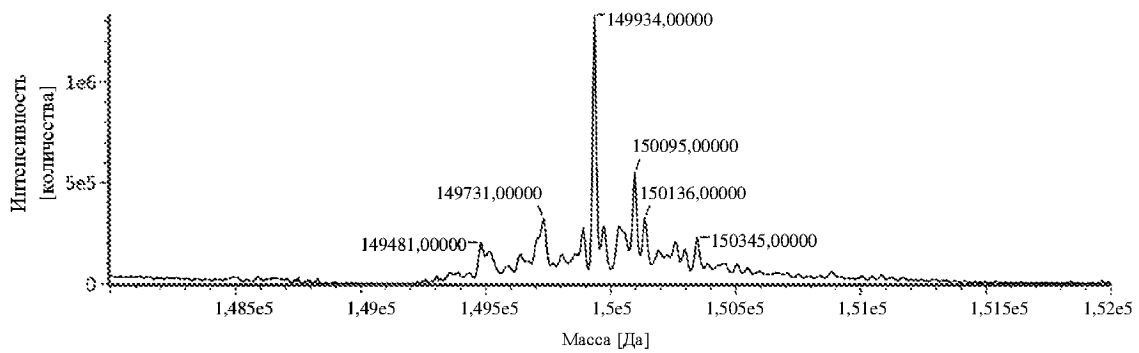
Фиг. 2



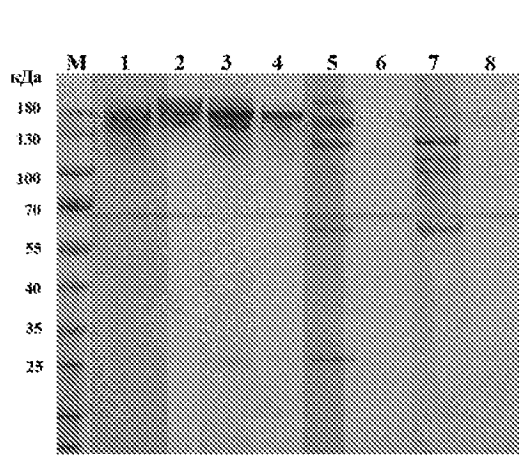
Фиг. 3



Фиг. 4

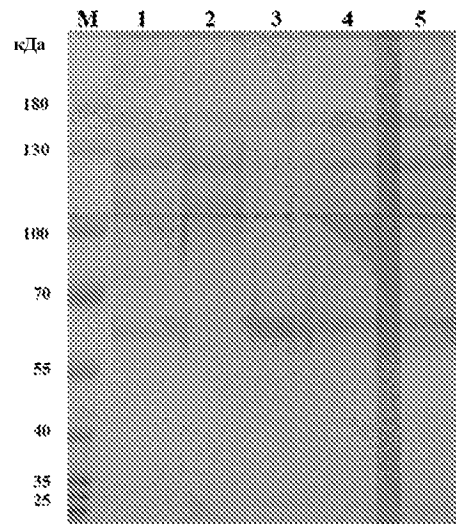


Фиг. 5



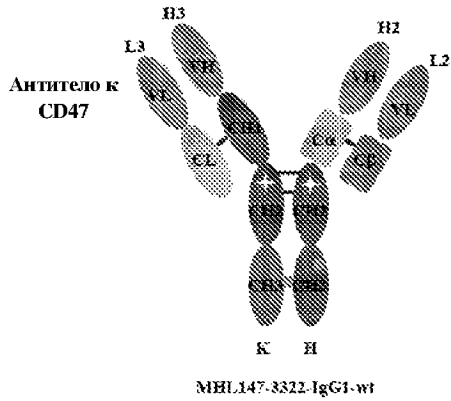
Дорожка М: маркер
 Дорожка 1: HZ5G11VH-CH1-IgG1+HZ5G11VL-IgK
 Дорожка 2: HZ14A9VH-CH1-IgG1+HZ14A9VL-IgK
 Дорожка 3: HZ5G11VH-CH1-IgG1+HZ14A9VL-IgK
 Дорожка 4: HZ14A9VH-CH1-IgG1+HZ5G11VL-IgK
 Дорожка 5: HZ5G11VH-C α -IgG1+HZ14A9VL-IgK
 Дорожка 6: HZ14A9VH-CH1-IgG1+HZ5G11VL-C β
 Дорожка 7: HZ14A9VH-C α -IgG1+HZ5G11VL-IgK
 Дорожка 8: HZ5G11VH-CH1-IgG1+HZ14A9VL-C β

Фиг. 6

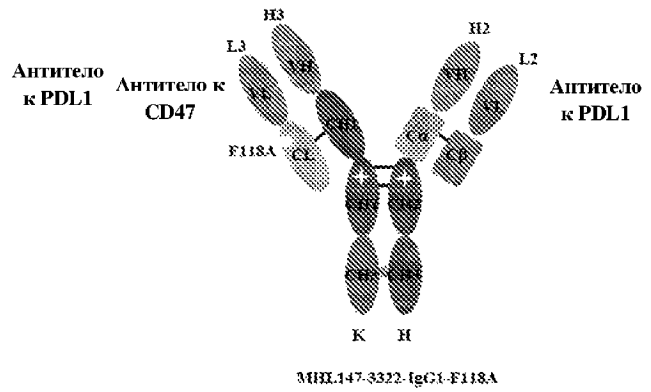


Дорожка М: маркер
 Дорожка 1: HZ14A9VH-C α -IgG1+HZ5G11VL-IgK
 Дорожка 2: HZ14A9VH-C α -IgG1+HZ5G11VL-IgK-F118I
 Дорожка 3: HZ14A9VH-C α -IgG1+HZ5G11VL-IgK-F118A
 Дорожка 4: HZ14A9VH-C α -IgG1+HZ5G11VL-IgK-F116A
 Дорожка 5: HZ14A9VH-C α -IgG1+HZ5G11VL-IgK-S114A

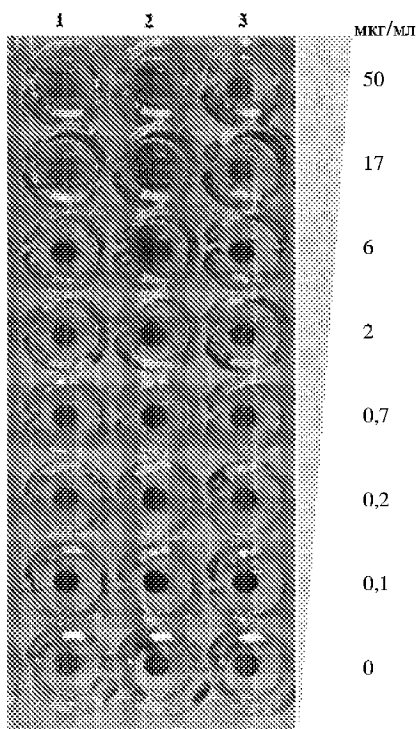
Фиг. 7



Фиг. 8

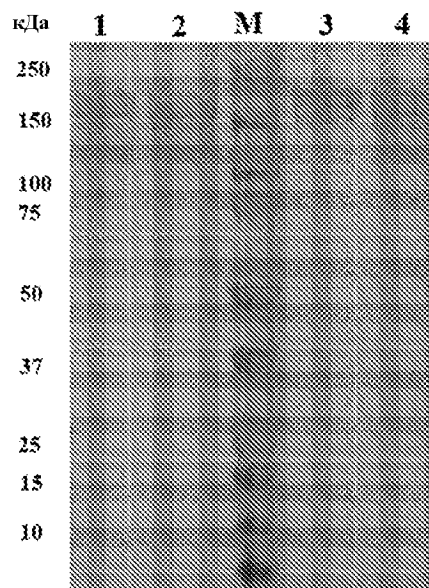


Фиг. 9



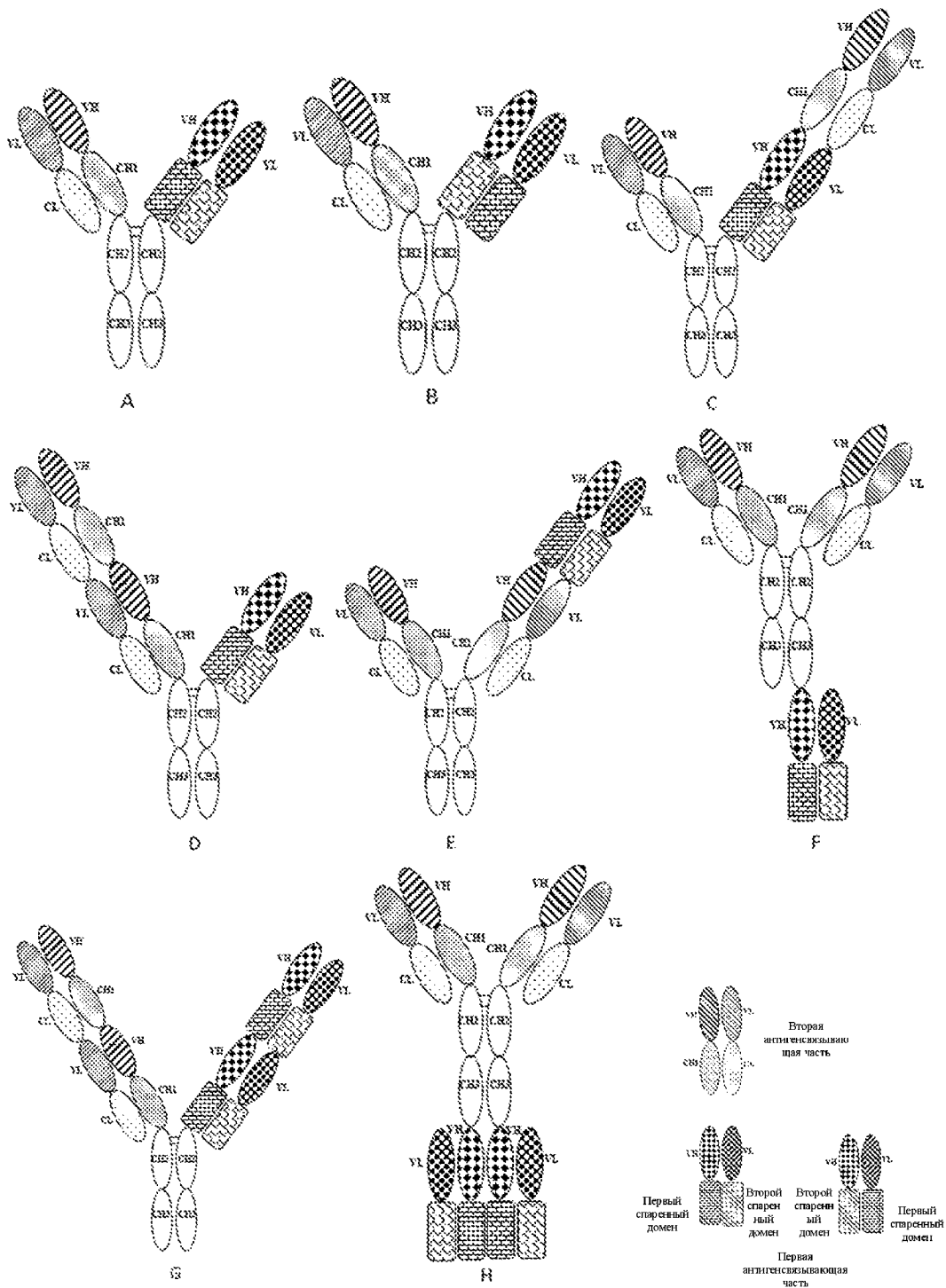
Дорожка 1: МНЛ147-332 2-IgG1-F118A
 Дорожка 2: МНЛ147-332 2-IgG1-wt
 Дорожка 3: hlgG1

Фиг. 10



Дорожка М: маркер
 Дорожка 1: HZ5G11-F118A
 Дорожка 2: HZ5G11
 Дорожка 3: HZ14A9
 Дорожка 4: HZ14A9-F118A

Фиг. 11



Фиг. 12