

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046272**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.02.21

(21) Номер заявки
201491908

(22) Дата подачи заявки
2013.04.19

(51) Int. Cl. **C07K 16/12** (2006.01)
C07K 16/26 (2006.01)
C07K 16/36 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(54) **СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ГЕТЕРОДИМЕРНЫХ АНТИТЕЛ И ПОЛУЧЕННЫЕ ГЕТЕРОДИМЕРНЫЕ АНТИТЕЛА**

(31) **61/635,935**

(32) **2012.04.20**

(33) **US**

(43) **2015.03.31**

(86) **PCT/NL2013/050294**

(87) **WO 2013/157954 2013.10.24**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕРЮС Н.В. (NL)

(72) Изобретатель:
**Де Крэйф Корнелис Адриан, Хендрикс
Линда Йоханна Алейда, Логтенберг
Тон (NL)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A1-2009089004
WO-A1-2011143545**

K. GUNASEKARAN ET AL.: "Enhancing Antibody Fc Heterodimer Formation through Electrostatic Steering Effects: APPLICATIONS TO BISPECIFIC MOLECULES AND MONOVALENT IgG", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 285, № 25, 18 June 2010 (2010-06-18), p. 19637-19646, XP055001947, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M110.117382, the whole document

(57) Изобретение относится к способу получения гетеродимерного антитела с помощью клетки-хозяина, где указанное антитело содержит два СН3-домена, которые способны образовывать поверхность контакта, гетеродимерному антителу для противоопухолевой терапии или терапии инфекционного заболевания, полученному указанным способом, рекомбинантной клетке-хозяину, способу ее получения, а также фармацевтической композиции, предназначенной для противоопухолевой терапии или терапии инфекционного заболевания, содержащей указанное гетеродимерное антитело.

B1

046272

**046272
B1**

Область изобретения

Изобретение относится к области молекулярной биологии, медицины и биологических терапевтических средств. В частности, оно относится к области терапевтических антител для лечения различных заболеваний.

Уровень техники

Многие в настоящее время используемые биологические лекарственные средства представляют собой выделенные рекомбинантные, человеческие или гуманизированные моноклональные антитела, которые усиливают способность иммунной системы организма нейтрализовывать или элиминировать клетки и/или молекулы, вовлеченные в процесс заболевания или уничтожать вторгшиеся патогены или инфекционные агенты. Моноклональные антитела связываются с одной конкретной областью или эпитопом антигена, и для применения в терапии их часто выбирают вследствие желаемого функционального свойства, например такого, как уничтожение опухолевых клеток, блокирование взаимодействий рецептор-лиганд или нейтрализация вируса. В настоящее время существует приблизительно 30 одобренных FDA моноклональных антител, которые, как правило, производятся в больших количествах, и их биофизические и биохимические характеристики могут быть детально проанализированы, чтобы обеспечить однородность характеристик от партии к партии, что повышает соответствия нормативным требованиям. Несмотря на эти благоприятные характеристики, моноклональные антитела имеют несколько недостатков, некоторые из которых связаны с их моноспецифической природой и комплексностью заболеваний. Процесс заболевания часто имеет многофакторную природу и вовлекает избыточное или синергическое действие медиаторов заболевания или активацию различных рецепторов, включая перекрестное взаимодействие между их сетями передачи сигнала. Следовательно, блокада множества различных факторов и каскадов, вовлеченных в патологию, может приводить к увеличению терапевтической эффективности. Вследствие их моноспецифичности, моноклональные антитела могут препятствовать только одной стадии комплексного процесса заболевания, что часто не обеспечивает оптимального эффекта. В дополнение к неполному контролю множества аспектов процесса заболевания, стало очевидным, что нацеливание на один эпитоп на единичном клеточном или растворимом белке или патогене часто не является достаточным для эффективного лечения заболевания, поскольку эпитоп-мишень может быть более недоступен для связывания моноклонального антитела и обеспечения желаемого эффекта. В качестве примера, опухолевые клетки часто ускользают от терапии моноклональным антителом посредством подавления, мутации или экранирования эпитопа-мишени, присутствующего на рецепторе фактора роста. Посредством активации альтернативных рецепторов и/или их лигандов, опухолевые клетки могут использовать другой путь, ведущий к продолжению роста и метастазированию. Аналогично вирусы и другие патогены часто могут мутировать и утрачивать или экранировать их эпитоп-мишень, тем самым ускользая от обработки моноклональным антителом. Моноклональные антитела, которые связываются с одним эпитопом, часто не привлекают полный спектр эффекторных механизмов, индуцированных поликлональными антителами, включая, среди прочего, опсонизацию (усиление фагоцитоза антигенов), пространственное препятствие (предотвращается связывание антигенов, открытых антителами, с клетками-хозяевами или поверхностями слизистых оболочек), нейтрализацию токсинов, агглютинацию или преципитацию (антитела, связывающие несколько растворимых антигенов, вызывают агрегацию и последующее выведение), активацию комплемента и антителозависимую клеточную цитотоксичность (антитела обеспечивают уничтожение клеток-мишеней естественными киллерными клетками и нейтрофилами).

Поликлональные антитела для терапевтических применений можно получать из объединенной сыворотки человека. Такие происходящие из сыворотки терапевтические поликлональные антитела, можно использовать, например, для лечения или предупреждения инфекций, вызванных вирусами, такими как вирус бешенства, цитомегаловирус и респираторно-синцитиальный вирус, для нейтрализации токсинов, таких как столбнячный токсин и ботулотоксин, или для предупреждения иммунизации аллотрансплантатом с резус-фактором D. Более широкому применению происходящих из сыворотки препаратов поликлональных антител препятствует тот факт, что источник плазмы доступен только для ограниченного диапазона мишеней, таких как инфекционные заболевания и токсины. Более того, продукты в высокой степени зависят от доступности донорской крови, как с точки зрения количества, так и с точки зрения пригодности, что приводит к значительному варьированию между партиями. Кроме того, технологии скрининга не успевают за постоянно эволюционирующими вирусами, таким образом, иммуноглобулиновые продукты несут в себе потенциальный риск передачи инфекционного заболевания. Наконец, длительные процессы взятия крови, скрининга и происходящие из плазмы иммуноглобулины, полученные способами очистки иммуноглобулинов, являются дорогостоящими.

Смеси моноклональных антител могут увеличить эффективность моноклональных антител, одновременно избегая ограничений, обусловленных происходящими из сыворотки поликлональными антителами. В данной области комбинации двух антител человека или гуманизированных моноклональных антител исследовали в доклинических моделях и клинических испытаниях (например, смеси 2 моноклональных антител против рецептора HER2, смеси 2 антител против рецептора EGFR и 2 моноклональных антител против вируса бешенства).

В данной области было показано, что комбинации 2 моноклональных антител могут иметь адди-

тивные или синергические эффекты и привлекают эффекторные механизмы, которые не ассоциированы с каким-либо антителом отдельно. Например, было показано, что смеси 2 моноклональных антител против EGFR или HER2 более эффективно уничтожают опухолевые клетки на основе комбинации видов активности, включающих усиленную интернализацию рецепторов, увеличенную блокаду каскадов передачи сигнала от рецепторов, а также усиленную опосредуемую иммунными эффекторами цитотоксичность. Для комбинированной терапии на основе 2 моноклональных антител составляющие антитела можно получать по отдельности и комбинировать на уровне белка. Недостатком этого подхода является непомерно высокая стоимость разработки 2 антител по отдельности в клинических испытаниях и (частично) повторение этого процесса для комбинации. Это может привести к неприемлемой стоимости лечения на основе комбинаций антител. Альтернативно 2 рекомбинантных клеточных линии, продуцирующих составляющие моноклональные антитела, можно смешивать в ферментере и полученную смесь антител можно очищать в качестве единого препарата (WO 2004/061104). Недостатком этого подхода является низкий контроль композиции и, таким образом, воспроизводимости полученного препарата рекомбинантных поликлональных антител, особенно с учетом того, что такие композиции могут изменяться с течением времени по мере культивирования клеток.

В ходе последнего десятилетия биспецифические антитела выступили в качестве альтернативы применению комбинаций 2 антител. В то время как комбинация 2 антител соответствует смеси 2 различных молекул иммуноглобулинов, которые связываются с различными эпитопами на одной и той же или на различных мишенях, в биспецифическом антителе это обеспечивается с помощью одной молекулы иммуноглобулина. Вследствие связывания с 2 эпитопами на одной и той же или на различных мишенях, биспецифические антитела могут иметь сходные эффекты по сравнению с комбинацией из 2 антител, связывающихся с теми же эпитопами. Более того, поскольку биспецифические антитела IgG-формата сочетают в себе 2 различных одновалентных связывающих области в одной молекуле и смеси 2 IgG-антител сочетают в себе 2 различных двухвалентных связывающих молекулы в одном препарате, также наблюдают различные эффекты этих форматов. С технологической и нормативной точки зрения, это делает разработку единого биспецифического антитела менее трудной, поскольку изготовление, доклиническое и клиническое исследование вовлекает одну молекулу. Таким образом, в пользу способов терапии на основе одного биспецифического антитела выступает менее трудный и экономичный процесс разработки лекарственного средства, при одновременном обеспечении более эффективной терапии на основе антител.

Биспецифические антитела на основе IgG-формата, состоящие из 2 тяжелых и двух легких цепей, получают различными способами. Например, биспецифические антитела можно получать путем слияния двух секретирующих антител клеточных линий с получением новой клеточной линии или путем экспрессии двух антител в одной клетке с использованием технологии рекомбинантных ДНК. Эти подходы обеспечили множество типов антител, поскольку соответствующие тяжелые цепи из каждого антитела могут образовывать моноспецифические димеры (также называемые гомодимерами), которые содержат две идентичных образованных пару тяжелых цепи с одинаковой специфичностью, и биспецифические димеры (также называемые гетеродимерами), которые содержат две различных образованных пару тяжелых цепи с различной специфичностью. Кроме того, легкие цепи и тяжелые цепи из каждого антитела могут случайным образом образовывать пару с образованием непригодных нефункциональных комбинаций. Эта проблема, известная как неправильное спаривание тяжелых и легких цепей, может быть решена путем выбора антител, которые имеют общую легкую цепь, для экспрессии в качестве биспецифических. Однако даже когда используют общую легкую цепь, экспрессия двух тяжелых цепей и одной общей легкой цепи в одной клетке приведет к 3 различным типам антител, т.е. двум моноспецифическим "родительским" антителам и биспецифическому антителу, так что представляющее интерес биспецифическое антитело необходимо очищать из полученной смеси антител. Хотя используют технологии дальнейшего увеличения процента биспецифических антител в смесях родительских и биспецифических антител и уменьшения процента неправильно спаренных тяжелых и легких цепей, остается потребность в биспецифических форматах, которые устраняют или минимизируют некоторые из недостатков, упомянутых выше.

В целом, уровень техники обеспечивает множество технологий и способов получения моноклональных антител, биспецифических антител, смесей моноклональных антител или смесей моноспецифических и биспецифических антител, которые впоследствии можно использовать для терапевтического применения у пациентов. Однако, как рассмотрено выше, каждая из этих существующих технологий и способов имеет недостатки и ограничения.

Таким образом, существует потребность в усовершенствованных и/или альтернативных технологиях для получения биологических лекарственных средств в форме смесей, или биспецифических подходах для нацеливания на несколько модифицирующих заболевание молекул.

Описание изобретения

Изобретение относится к способам и средствам для усовершенствованных и/или альтернативных технологий получения биологических лекарственных средств в форме смесей или к биспецифическим подходам для нацеливания на несколько модифицирующих заболевание молекул, а также к продуктам и применениям в результате этих способов и средств.

В данной области описаны различные подходы для способствования образованию определенного представляющего интерес биспецифического антитела, тем самым уменьшая содержание нежелательных антител в полученной смеси.

Для антител хорошо известно, что взаимодействие СНЗ-СНЗ является основной движущей силой для димеризации Fc (Ellerson J.R. et al., *J. Immunol.*, 1976(116)510-517; Deisenhofer J. *Biochemistry*, 1981(20)2361-2370). Более того, хорошо известно, что, когда два СНЗ-домена взаимодействуют друг с другом, они встречаются на поверхности контакта белок-белок, которая содержит "контактные" остатки (также называемые контактными аминокислотами, остатками поверхности контакта или аминокислотами поверхности контакта). Контактные аминокислоты первого СНЗ-домена взаимодействуют с одной или несколькими контактными аминокислотами второго СНЗ-домена. Контактные аминокислоты, как правило, находятся в пределах 5,5 Å (предпочтительно в пределах 4,5 Å) друг от друга в трехмерной структуре антитела. Взаимодействие между контактными остатками из одного СНЗ-домена и контактными остатками из другого СНЗ-домена может осуществляться, например, через ван-дер-ваальсовы силы, водородные связи, опосредуемые водой водородные связи, солевые мостики или другие электростатические силы, силы притяжения между ароматическими боковыми цепями, дисульфидные связи или другие силы, известные специалисту в данной области. Ранее было показано, что приблизительно треть боковых цепей контактных аминокислот на поверхности контакта СНЗ-домена IgG1 человека может обуславливать основной вклад в сворачивание и ассоциацию домена. Кроме того, предполагалось, что другие (соседние) аминокислотные остатки могут влиять на взаимодействия на поверхности контакта белок-белок.

В данной области используют подходы, препятствующие димеризации тяжелых цепей антител. Использовали определенную модификацию способами инженерии СНЗ-доменов, чтобы способствовать гетеродимеризации относительно гомодимеризации. Примеры такой модификации способами инженерии поверхности контакта СНЗ-СНЗ включают внесение мутаций, обеспечивающих комплементарные выступы и полости, также известное как подходы "выступ-в-полости", как описано, например, в WO 1998/050431; Ridgeway et al., 1996; и Merchant et al., 1998.

Как правило, способ вовлекает внесение выпуклости на поверхности контакта первого полипептида и соответствующего углубления на поверхности контакта второго полипептида, так чтобы выступ мог располагаться в полости, обеспечивая образование гетеромультимера и препятствуя образованию гомомультимера. "Выпуклости" или "выступы" конструируют путем замены небольших боковых цепей аминокислот на поверхности контакта первого полипептида более крупными боковыми цепями (например, тирозин или триптофан). На поверхности контакта второго полипептида создают компенсирующие "углубления" или "полости" идентичного или сходного размера с выпуклостями путем замены крупных боковых цепей аминокислот меньшими (например, аланин или треонин). Выпуклость и углубление можно вносить способами синтеза, такими как изменение нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды, или пептидный синтез.

При использовании технологии "выступ-в-полости" отдельно доля представляющего интерес биспецифического антитела составляет в наилучшем случае 87% смеси 2 родительских и биспецифических антител. Merchant et al. успешно увеличили долю биспецифических антител до 95% смеси путем внесения дополнительной дисульфидной связи между двумя доменами СНЗ на поверхности контакта СНЗ-СНЗ. Тем не менее, чтобы использовать такое биспецифическое антитело в качестве лекарственного средства, биспецифическое антитело необходимо очистить (отделить) от гомодимеров и составить в фармацевтически приемлемом разбавителе или эксципiente. Очистка гетеродимеров из таких смесей является главной проблемой, вследствие сходства физико-химических свойств гомодимеров и гетеродимеров. Задачей настоящего изобретения является предоставление способов получения биспецифического антитела из клона единичной клетки с еще более увеличенной долей биспецифического антитела в смеси. Таким образом, в соответствии с изобретением, технологию "выступ-в-полости" можно использовать в качестве одного из средств, отдельно или вместе с другими средствами, для достижения указанного дальнейшего повышения доли биспецифического антитела в смеси.

Другим примером такой модификации способами инженерии поверхности контакта СНЗ-СНЗ является технология гетеродимерных Fc, которая способствует конструированию биспецифических и асимметричных слитых белков посредством разработки гетеродимеров СНЗ с модифицированным способом инженерии доменом с обменом цепями (SEED). Эти гетеродимеры СНЗ SEED являются производными доменов СНЗ IgG и IgA человека, которые состоят из чередующихся сегментов последовательностей СНЗ IgA и IgG человека, которые приводят к парам комплементарных гетеродимеров СНЗ SEED человека, так называемым SEED-тельцам (Davis J.H. et al., *Protein Engineering, Design & Selection*, 2010(23)195-202; WO 2007/110205).

Другой подход для получения данного представляющего интерес биспецифического антитела основан на электростатической модификации способами инженерии контактных остатков на поверхности контакта СНЗ-СНЗ, которые заряжены естественным образом, например, как описано в EP 01870459; или US 2010/0015133; WO 2007/147901; WO 2010/129304; Gunasekaran et al. (2010); и WO 2009/089004. В этих публикациях описаны мутации в доменах СНЗ тяжелых цепей, где встречающиеся в природе заря-

женные контактные аминокислотные остатки заменены аминокислотными остатками противоположного заряда (т.е. стратегия обращения заряда). Это обеспечивает измененную полярность заряда на поверхности контакта димера Fc так, что коэкспрессия электростатически соответствующих Fc-цепей способствует благоприятным силам притяжения, тем самым стимулируя образование желаемого гетеродимера Fc, в то время как неблагоприятный отталкивающий заряд подавляет образование нежелательного гомодимера Fc.

Было описано, что на поверхности контакта СНЗ-СНЗ четыре уникальных пары заряженных остатков вовлечены во взаимодействие домен-домен. Они представляют собой D356/K439', E357/K370', K392/D399' и D399/K409' (нумерация в соответствии с Kabat (1991), где остатки в первой цепи отделены от остатков во второй цепи с помощью '/' и где штрих (') указывает на нумерацию остатка во второй цепи). Поскольку поверхность контакта СНЗ-СНЗ обладает симметрией 2-го порядка, каждая уникальная пара зарядов представлена дважды в интактном IgG (т.е. также на поверхностях контакта присутствуют зарядовые взаимодействия K439/D356', K370/E357', D399/K392' и K409/D399'). Учитывая эту симметрию второго порядка, было продемонстрировано, что однократное обращение заряда, например, K409D в первой цепи или D399'K во второй цепи, привело к уменьшенному образованию гомодимера вследствие отталкивания идентичных зарядов. Комбинирование различных обращений заряда далее усилило этот эффект отталкивания. Было продемонстрировано, что экспрессия различных доменов СНЗ, содержащих различные комплементарные обращения заряда, может способствовать гетеродимеризации, что приводит к увеличенной доле биспецифических типов молекул в смеси.

С использованием подхода, описанного выше, можно получить биспецифическое антитело в одной клетке с содержанием в диапазоне от приблизительно 76% до приблизительно 96%. Задачей настоящего изобретения является предоставление способов получения биспецифического антитела в единичной клетке с еще более увеличенным процентом желаемых биспецифических антител. В соответствии с настоящим изобретением, в качестве одного из средств можно использовать технологию инженерии электростатического заряда, отдельно или вместе с другими средствами, например, подходами "выступ-впадины", для достижения указанных еще более увеличенных процентов желаемых (биспецифических) антител.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения по меньшей мере двух различных Ig-подобных молекул из одной клетки-хозяина, где каждая из двух указанных Ig-подобных молекул содержит два СНЗ-домена, которые способны образовывать поверхность контакта, причем указанный способ включает предоставление в указанной клетке

- a) первой молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей 1-ю содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь;
- b) второй молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей 2-ю содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь;
- c) третьей молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей 3-ю содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь; и
- d) четвертой молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей 4-ю содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь,

где по меньшей мере две из указанных молекул нуклеиновой кислоты предоставлены с помощью средств для предпочтительного спаривания указанных 1- и 2-го содержащих СНЗ-домен полипептидов и указанных 3- и 4-го содержащих СНЗ-домен полипептидов, причем указанный способ, кроме того, включает стадии культивирования клетки-хозяина, и обеспечения экспрессии указанных по меньшей мере четырех молекул нуклеиновой кислоты, и сбора указанных по меньшей мере двух различных Ig-подобных молекул из культуры.

Часто является желательным получение более одного (биспецифического) антитела, например, для более эффективного препятствования множеству биологических каскадов, вовлеченных в процесс заболелания, или инвазии, репликации и/или распространению патогена.

Смесь более одного биспецифического антитела также является особенно пригодной для лечения определенных заболеваний. Например, опухолевые клетки используют множество различных стратегий для развития устойчивости во время лечения антителами или низкомолекулярными лекарственными средствами. Устойчивость может вовлекать несколько рецепторов клеточной поверхности и растворимых молекул, и считается полезной разработка способов лечения на основе антител от злокачественных опухолей, которые направлены на множество таких ассоциированных с заболеванием и ускользанием молекул одновременно. В случае когда вовлечено более 2 связанных с заболеванием и ускользанием молекул или эпителиев, смесь биспецифических антител обеспечивает инновационный и перспективный терапевтический формат. Предпочтительно такие смеси биспецифических антител продуцируются одной клеткой, чтобы обеспечить процесс разработки лекарственного средства, который является менее трудным с нормативной точки зрения и экономичным и осуществимым с точки зрения производства и клинической разработки лекарственного средства. В подходе на основе единичных клеток является желательным использование способов, которые обеспечивают контролируемое и эффективное получение биспецифических антител, таким образом, снижая или даже полностью устраняя необходимость в отделении желаемой смеси биспецифических IgG-молекул от нежелательных моноспецифических IgG-молекул. На уровне тех-

ники смеси моноспецифических и биспецифических антител продуцировали из единичной клетки (WO 2004/009618), однако эти смеси отражают комплексные совокупности нескольких различных биспецифических и моноспецифических типов антител. Следующей задачей настоящего изобретения является предоставление средств и способов для получения определенных смесей биспецифических антител в единичных клетках. Предпочтительно предусматриваются способы, которые приводят к смесям (биспецифических) антител с долей по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или даже более 99% димерных IgG-молекул, безотносительно количества мономерных побочных продуктов, см. в настоящем описании ниже. Как правило, в клетке, где продуцируется множество интактных IgG-молекул, могут присутствовать половинные молекулы (мономерные побочные продукты), которые могут быть просто удалены с помощью эксклюзионной хроматографии, известной в данной области.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способам получения смеси с определенным составом из по меньшей мере двух различных Ig-подобных молекул в единичных клетках вместо одного (биспецифического) представляющего интерес антитела, где образование других нежелательных димерных типов антител снижено или даже отсутствует. Полученная смесь имеет точно определенный состав, и этот состав контролируют путем конструирования мутантов СНЗ-домена. Более того, регуляция уровней экспрессии и/или различные соотношения при трансфекции, используемые для экспрессии, влияют на состав смеси. В способе по изобретению первая молекула нуклеиновой кислоты кодирует СНЗ-домен, который предпочтительно образует пару с СНЗ-доменом, кодируемым второй молекулой нуклеиновой кислоты, и третья нуклеиновая кислота молекулы кодирует СНЗ-домен, который предпочтительно образует пару с СНЗ-доменом, кодируемым четвертой молекулой нуклеиновой кислоты. Настоящее изобретение также относится к смесям по меньшей мере двух различных Ig-подобных молекул, получаемых способами по изобретению.

Как используют в рамках изобретения, термин "предпочтительное образование пар между указанными 1- и 2-м содержащими СНЗ-домен полипептидами" означает, что по существу все из полученных димеров, содержащих 1-й содержащий СНЗ-домен полипептид и/или 2-й содержащий СНЗ-домен полипептид, представляют собой димеры, состоящие из одного 1-го содержащего СНЗ-домен полипептида, образовавшего пару с одним 2-м содержащим СНЗ-домен полипептидом. Аналогично термин "предпочтительное образование пар указанных 3- и 4-го содержащих СНЗ-домен полипептидов" означает, что по существу все из полученных димеров, содержащих 3-ий содержащий СНЗ-домен полипептид и/или 4-й содержащий СНЗ-домен полипептид, представляют собой димеры, состоящие из одного 3-го содержащего СНЗ-домен полипептида, образовавшего пару с 4-ым содержащим СНЗ-домен полипептидом. В результате, когда молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие четыре различных (А, В, С, D) содержащих СНЗ-домен полипептида, вводят в единичную клетку вместо смеси 10 различных Ig-подобных димеров (AA, AB, AC, AD, BB, BC, BD, CC, CD и DD), образуется смесь в преимущественно двух конкретных Ig-подобных молекул.

Как более подробно объяснено в настоящем описании ниже, в предпочтительном варианте осуществления указанная первая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит аминокислотную замену Т366К, и указанная вторая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит аминокислотную замену L351D. Эти аминокислотные замены являются предпочтительными средствами для преимущественного образования пар между указанными первой и второй содержащими СНЗ-домен полипептидными цепями. Указанная первая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь предпочтительно дополнительно содержит аминокислотную замену L351К. Более того, указанная вторая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь предпочтительно дополнительно содержит аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из Y349E, Y349D и L368E, наиболее предпочтительно L368E. В другом предпочтительном варианте осуществления указанная третья содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит аминокислотные замены E356К и D399К, и указанная четвертая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит аминокислотные замены K392D и K409D.

В способе в соответствии с настоящим изобретением каждая из содержащих СНЗ-домен полипептидных цепей дополнительно содержит вариабельную область, распознающую эпитоп-мишень. Вариабельные области, которые являются частью содержащих СНЗ-домен полипептидных цепей, предпочтительно имеют общую легкую цепь. В этом случае только VH вариабельных областей различаются, в то время как VL во всех вариабельных областях являются по существу одинаковыми. Таким образом, в предпочтительном аспекте предусматривается способ по изобретению, который дополнительно включает предоставление указанной клетке-хозяину молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей общую легкую цепь. В одном особенно предпочтительном варианте осуществления каждая из указанных 4 вариабельных областей 4 содержащих СНЗ-домен полипептидных цепей распознает отличающийся эпитоп-мишень. Например, если первая молекула нуклеиновой кислоты кодирует тяжелую цепь, которая дополнительно содержит вариабельный домен, обладающий специфичностью к антигену А, вторая молекула нуклеиновой кислоты кодирует тяжелую цепь, которая дополнительно содержит вариабельный домен, обладающий специфичностью к антигену В, третья молекула нуклеиновой кислоты кодирует тяжелую цепь, которая дополнительно содержит вариабельный домен, обладающий специфичностью к антигену С, и четвертая молекула нуклеиновой кислоты кодирует тяжелую цепь, которая дополнительно содержит вариабельный домен, обладающий специфичностью к антигену D.

белый домен, обладающий специфичностью к антигену D, то будет получена смесь, содержащая биспецифические Ig-подобные молекулы, которые являются специфичными к АВ, и биспецифические Ig-подобные молекулы, которые являются специфичными к CD. Образование моноспецифических антител (со специфичностью к АА, ВВ, СС или DD) или биспецифических антител со специфичностью к АС, АД, ВС или ВD снижается или даже отсутствует с помощью средств для предпочтительного образования пар указанных 1- и 2-го содержащих СНЗ-домен полипептидов и указанных 3- и 4-го содержащих СНЗ-домен полипептидов. Безусловно, можно использовать дополнительные молекулы нуклеиновой кислоты, например кодирующие 5- и 6-й содержащие СНЗ-домен полипептиды, для получения определенных смесей, содержащих более двух различных Ig-подобных молекул.

Следует отметить, что соотношение нуклеиновых кислот, используемых в способе по изобретению, не должно составлять 1:1:1:1, и соотношение полученных Ig-подобных молекул, которые экспрессируются, не должно составлять 1:1. Возможно использовать средства, известные в данной области, для получения смесей антител с оптимизированными соотношениями. Например, уровни экспрессии молекул нуклеиновой кислоты и, таким образом, соотношения полученных Ig-подобных молекул, можно регулировать с использованием различных генетических элементов, таких как промоторы, энхансеры и репрессоры, или посредством контроля участка встраивания в геном или количества копий конструкций ДНК, кодирующих антитела.

Указанные средства для преимущественного образования пар предпочтительно могут включать внесенные способами инженерии комплементарные мутации "выступ-в-полости", дисульфидные мостики, мутации заряда, включая мутации с обращением заряда, или их комбинации. Квалифицированному специалисту будет понятно, что указанные средства для преимущественного образования пар могут быть выбраны из определенного типа мутаций, т.е. все из по меньшей мере 4 молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих содержащие СНЗ-домен полипептидные цепи, могут, например, содержать мутации заряда в качестве средств предпочтительного образования пар. Кроме того, также в определенных случаях можно использовать не модифицированный способами инженерии СНЗ дикого типа для преимущественного образования пар между двумя содержащими СНЗ-домен полипептидными цепями дикого типа. В особенно предпочтительном варианте осуществления указанное средство для преимущественного образования пар включает по меньшей мере одну мутацию СНЗ, выбранную из табл. В, как объяснено в настоящей заявке. Таким образом, один предпочтительный вариант осуществления относится к способу в соответствии с настоящим изобретением, где все 4 из указанных молекул нуклеиновой кислоты предоставлены со средствами для преимущественного образования пар между указанными 1- и 2-м содержащими СНЗ-домен полипептидами и указанными 3- и 4-м содержащими СНЗ-домен полипептидами, где указанное средство для преимущественного образования пар между указанными 1- и 2-м содержащими СНЗ-домен полипептидами отличаются от средств для преимущественного образования пар между указанными 3 и 4-м содержащими СНЗ-домен полипептидами.

Один аспект настоящего изобретения относится к способу по изобретению, где указанное средство для преимущественного образования пар между указанными 1- и 2-м содержащими СНЗ-домен полипептидами отличается от указанных средств для преимущественного образования пар между указанными 3- и 4-м содержащими СНЗ-домен полипептидами. Под "отличающимся" подразумевают, что средства для преимущественного образования пар между указанными 1- и 2-м содержащими СНЗ-домен полипептидами сконструированы так, чтобы способствовать преимущественному образованию пар между 1- и 2-й цепями. Конструкция является такой, чтобы по существу не происходило взаимодействия между 1- и 3- и/или 4-й содержащими СНЗ-домен полипептидными цепями. Иными словами, димеризация между указанным 1-м содержащим СНЗ-домен полипептидом и указанным 3- или 4-м полипептидом снижается по существу до нуля и т.п. 3- и 4-й Содержащие СНЗ-домен полипептиды либо могут представлять собой полипептиды дикого типа, либо могут содержать средства для преимущественного образования пар, которые отличаются от средств для преимущественного образования пар между 1- и 2-м СНЗ-доменами. Современные исследования были сфокусированы на продуцировании одного биспецифического антитела с использованием, например, технологии "выступ-в-полости" или мутаций (реверсий) заряженных контактных аминокислот, присутствующих в СНЗ-доменах. Однако получение определенных смесей по меньшей мере двух (биспецифических) Ig-подобных молекул без значительного дополнительного продуцирования других димерных побочных продуктов не было осуществлено до настоящего изобретения.

Настоящее изобретение относится к способам эффективного и контролируемого получения смеси Ig-подобных молекул с точно определенным составом, содержащей высокую долю биспецифических молекул в смеси. В системе, в которой являются желательными две биспецифических молекулы, достигают даже доли (двух) биспецифических соединений по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или более. Это означает, что получают только не более 5%, не более 3% или менее моноспецифических двухвалентных побочных продуктов. Следует отметить, что количество мономерных побочных продуктов, т.е. половинных молекул, является менее важным, поскольку эти половинные молекулы без труда отделяют от димеров с использованием их отличий по размеру.

В другом предпочтительном варианте осуществления осуществления вариabельные области 1- и 2-й содержащих СНЗ-домен полипептидных цепей распознают различные эпитопы-мишени, в то время как вариabельные

области 3- и 4-й содержащих СНЗ-домен полипептидных цепей распознают те же эпитопы-мишени. Это приводит к преимущественному образованию одного типа биспецифической Ig-подобной молекулы и одного типа моноспецифической Ig-подобной молекулы. Например, если переменные области 1- и 2-й содержащих СНЗ-домен полипептидных цепей распознают различные эпитопы-мишени и если обе переменные области 3- и 4-й содержащих СНЗ-домен полипептидных цепей распознают один и тот же эпитоп-мишень, который отличается от эпитопов-мишеней, распознаваемых 1- и 2-м СНЗ-доменами, будет образовываться смесь Ig-подобных молекул, обладающих специфичностью к АВ или СС. Кроме того, таким образом, предусматривается способ по изобретению, где эпитоп-мишень, распознаваемый переменными областями 3- и 4-й содержащими СНЗ-домен полипептидными цепями, является одинаковым, но отличается от эпитопа-мишени, распознаваемого переменной областью 1- или 2-й содержащих СНЗ-домен полипептидных цепей.

Альтернативно, когда переменные области 1- и 2-й содержащих СНЗ-домен полипептидных цепей распознают различные эпитопы-мишени, и когда обе переменные области 3- и 4-й содержащих СНЗ-домен полипептидных цепей распознают тот же эпитоп, что и 1- или 2-я содержащие СНЗ-домен полипептидные цепи, будет образовываться смесь Ig-подобных молекул, обладающих специфичностью к АВ и АА, или АВ и ВВ. Таким образом, также предусматривается способ по изобретению, где эпитоп-мишень, распознаваемый переменными областями 3- и 4-й содержащих СНЗ-домен полипептидных цепей, является таким же, как и эпитоп-мишень, распознаваемый переменной областью 1- или 2-й содержащих СНЗ-домен полипептидных цепей.

Другой задачей настоящего изобретения является предоставление средств и способов для получения определенных смесей биспецифических антител и моноспецифических антител в культуре отдельных клеток. Неограничивающим примером такой смеси с точно определенным составом является смесь биспецифических антител со специфичностью АВ и моноспецифических антител со специфичностью АА. Другим примером является смесь биспецифических антител со специфичностью АВ и моноспецифических антител со специфичностью ВВ. Другим примером является смесь биспецифических антител со специфичностью АВ и моноспецифических антител со специфичностью СС. Вновь предпочтительно предусматриваются средства и способы, которые обеспечивают смеси представляющих интерес антител с по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 97% или даже более 99% желаемых антител.

В другом варианте осуществления предусматривается способ по изобретению, где переменные области 1- и 2-й содержащих СНЗ-домен полипептидных цепей распознают один и тот же эпитоп-мишень, в то время как переменные области 3- и 4-й содержащих СНЗ-домен полипептидных цепей распознают второй эпитоп-мишень, который отличается от эпитопа-мишени, распознаваемого указанными 1- и 2-й переменными областями. Это приведет к преимущественной продукции моноспецифических Ig-подобных молекул, обладающих либо специфичностью к АА, либо специфичностью к ВВ. Образование биспецифических Ig-подобных молекул снижается или даже устраняется. В нескольких вариантах осуществления является предпочтительным продуцирование смесей моноспецифических антител в одной клетке, а не смесей биспецифических антител. Например, это является предпочтительным, когда является желательным сшивание двух идентичных молекул-мишеней, или когда две мишени расположены слишком далеко друг от друга так, что они не могут связываться одним биспецифическим антителом. Также может быть предпочтительным получение смесей моноспецифических антител в единичной клетке, поскольку смесь может считаться единым терапевтическим продуктом. В данной области терапевтическая эффективность и безопасность различных моноспецифических антител уже была доказана, и было получено разрешение для выпуска в продажу. Таким образом, получение смесей моноспецифических антител в одной клетке будет упрощать исследование эффективности и безопасности нескольких таких смесей и снизит усилия и затраты на разрешение контролирующего органа и производство. Однако в настоящее время не существует способов, доступных для получения конкретных смесей моноспецифических антител в одной клетке, где образование биспецифических побочных продуктов снижено до менее чем 5%. Другой задачей настоящего изобретения является предоставление средств и способов для получения таких смесей с определенным составом из гомодимерных антител в единичных клетках, где образование биспецифических антител снижено до уровня менее 5%.

Таким образом, способ в соответствии с настоящим изобретением является пригодным для получения любой желаемой смеси биспецифических и/или моноспецифических Ig-подобных молекул. Вновь является возможным использование дополнительных молекул нуклеиновой кислоты, например, кодирующих 5- и 6-й (и 7- и 8-й и т.д.) содержащих СНЗ-домен полипептид, для получения смесей с определенным составом, содержащих более двух различных Ig-подобных молекул.

Предпочтительно в способе в соответствии с настоящим изобретением используют по меньшей мере два СНЗ-домена, которые содержат по меньшей мере одну комбинацию мутаций, предусматриваемых настоящим изобретением. С помощью этих мутаций формируются новые специфические взаимодействия между двумя СНЗ-доменами. Эти мутации в соответствии с настоящим изобретением более подробно рассмотрены ниже.

Термин "Ig-подобная молекула", как используют в рамках изобретения, означает белковую молеку-

лу, которая обладает по меньшей мере одним доменом иммуноглобулина (Ig). Указанная Ig-подобная молекула содержит последовательность, имеющую функцию по меньшей мере СН3-домена иммуноглобулина, предпочтительно последовательность содержит СН3-домен IgG1. Белковые молекулы, которые обладают по меньшей мере СН3-доменом, могут быть далее снабжены определенными связывающими частями. СН3-домены по настоящему изобретению, содержащие средства для преимущественного образования пар, таким образом, можно использовать для преимущественного образования пар между двумя содержащими СН3-домен белковыми молекулами для конструирования желаемых гетеродимерных связывающих молекул или смесей связывающих молекул. Связывающие части, которые могут быть включены в содержащие СН3-домен белковые молекулы, могут представлять собой любую связывающую структуру, включая, но не ограничиваясь ими, одноцепочечные Fv, одноцепочечные или тандемные диантитела (TandAb®), VHH, Anticalin®, Nanobody®, BiTE®, Fab, белки с анкириновыми повторами или DARPIN®, Avimer®, DART, TCR-подобное антитело, Adnectin®, Affilin®, Trans-body®, Affibody®, TrimerX®, MicroProteins, Fynomer®, Centyrin® или KALBITOR®. В предпочтительном варианте осуществления связывающие части представляют собой переменные области антител (т.е. комбинации VH/VL). Переменные области, которые являются частью содержащих СН3-домен полипептидных цепей, предпочтительно имеют общую легкую цепь. В этом случае отличаются только VH переменных областей, в то время как VL во всех переменных областях являются по существу одинаковыми.

Альтернативно или дополнительно к СН3-доменам по настоящему изобретению можно присоединять способами инженерии другие молекулы, включая цитокины, гормоны, растворимые лиганды, рецепторы и/или пептиды.

В более предпочтительном варианте осуществления указанная Ig-подобная молекула содержит полноразмерный остов Fc. В наиболее предпочтительном варианте осуществления Ig-подобные молекулы представляют собой антитела. Переменные области этих антител предпочтительно обладают общей легкой цепью, однако они могут различаться в их VH-областях. Термин "антитело", как используют в рамках изобретения, означает белковую молекулу, принадлежащую иммуноглобулиновому классу белков, содержащую один или несколько доменов, которые связывают эпитоп на антигене, где такие домены происходят из переменной области антитела или обладают гомологией последовательности с ней.

Антитела известны в данной области и включают несколько изотипов, таких как IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE и IgM. Антитело по изобретению может представлять собой любой из этих изотипов или их функциональное производное и/или фрагмент. В предпочтительном варианте осуществления получают Ig-подобные молекулы, которые представляют собой антитела IgG-изотипа, поскольку IgG-антитела, например, имеют более длительное время полужизни по сравнению с антителами других изотипов.

Антитела, полученные способами в соответствии с настоящим изобретением, могут иметь последовательности любого происхождения, включая последовательности мыши и человека. Антитела могут состоять из последовательностей, имеющих только одно происхождение, или они могут иметь последовательности, имеющие более одного происхождения, с образованием например химерных или гуманизированных антител. Антитела для терапевтического применения, предпочтительно настолько сходны с природными антителами индивидуума, подвергаемого лечению, насколько это возможно (например, антитела человека для людей). Связывание антитела может быть выражено в величинах специфичности и аффинности. Специфичность определяет, какой антиген или его эпитоп связывается связывающим доменом. Аффинность является мерой прочности связывания с конкретным антигеном или эпитопом. Специфическое связывание определяют как связывание с аффинностью (K_D) по меньшей мере 1×10^{-5} М, более предпочтительно 1×10^{-7} М, более предпочтительно более 1×10^{-9} М. Как правило, моноклональные антитела для терапевтического применения обладают аффинностью вплоть до 1×10^{-10} М или даже выше. Термин "антиген", как используют в рамках изобретения, означает вещество или молекулу, которые при введении в организм запускают продукцию антитела иммунной системой. Антиген, среди прочих, может происходить из патогенных организмов, опухолевых клеток или других аберрантных клеток, из гаптенов или даже из собственных структур. На молекулярном уровне антиген характеризуется способностью быть связанным антигенсвязывающим участком антитела. Также "антигеном" могут считаться смеси антигенов, т.е. квалифицированному специалисту будет понятно, что иногда лизат опухолевых клеток или вирусные частицы могут быть указаны как "антиген", в то время как такой лизат опухолевых клеток или препарат вирусных частиц состоит из множества антигенных детерминант. Антиген содержит по меньшей мере один эпитоп, но часто более. Термин "эпитоп", как используют в рамках изобретения, означает часть антигена, которая распознается иммунной системой, в частности, антителами, В-клетками или Т-клетками. Хотя обычно полагают, что эпитопы происходят из несобственных белков, последовательности, происходящие из хозяина, которые могут распознаваться, также классифицируют как эпитопы.

Термин "СН3-домен" хорошо известен в данной области. Структура IgG имеет четыре цепи: две легких цепи и две тяжелых цепи; каждая легкая цепь имеет два домена: переменная и константная область легкой цепи (VL и CL), и каждая тяжелая цепь имеет четыре домена: переменный домен тяжелой цепи (VH) и три константных домена тяжелой цепи (CH1, CH2, CH3). Область CH2- и CH3-домена тяжелой цепи называют областью Fc (кристаллизующийся фрагмент), Fc-фрагментом, Fc-остовом или просто

Fc. Молекула IgG представляет собой гетеротетрамер, имеющий две тяжелых цепи, которые удерживаются вместе дисульфидными связями (-S-S-) в шарнирной области и двумя легкими цепями. Тяжелые цепи димеризуются посредством взаимодействий на поверхности контакта доменов CH3-CH3 и посредством взаимодействий в шарнирной области. Количество дисульфидных связей в шарнирной области варьирует среди подклассов иммуноглобулинов (Paradea and Check, 1989). Fc-фрагмент молекулы иммуноглобулина представляет собой димер двух C-концевых константных областей, т.е. CH2- и CH3-доменов, тяжелой цепи. Среди его физиологических функций находятся взаимодействия с системой комплемента и с определенными рецепторами на поверхности различных клеток. Известно, что взаимодействия между CH3-доменами двух индивидуальных тяжелых цепей играют важную роль в запуске димеризации тяжелых цепей. Таким образом, CH3-домены контролируют ассоциацию тяжелых цепей антитела, и известно, что поверхность контакта между CH3-доменами содержит более 20 контактных остатков из каждой цепи, которые участвуют во взаимодействии CH3-CH3 (Deisenhofer J., *Biochemistry*, 1981(20)2361-2370; Miller S., *J. Mol. Biol.*, 1990(216)965-973; Padlan, *Advances in Protein Chemistry*, 1996(49)57-133). Таким образом, варианты CH3 по настоящему изобретению можно использовать вместе с другими доменами антител для получения полноразмерных антител, которые являются либо биспецифическими, либо моноспецифическими. Специфичность антитела, определяемая комбинациями VH/VL, как правило, не влияет на поведение димеризации тяжелых цепей, обеспечиваемое доменами CH3.

Термины "контактный остаток", "контактная аминокислота", "остаток поверхности контакта" и "аминокислота поверхности контакта", как используют в рамках изобретения, как правило, относится к любому аминокислотному остатку, присутствующему в CH3-доме, который может быть вовлечен в контакты между доменами, что можно определять с помощью технологий, известных в данной области, в том числе путем вычисления доступной для растворителя площади поверхности (ASA) остатков CH3-домена в присутствии и в отсутствие второй цепи (Lee and Richards *J. Mol. Biol.*, 1971(55)379), где остатки, которые демонстрируют разность ($>1 \text{ \AA}^2$) в ASA между двумя результатами вычислений идентифицируют как контактные остатки. Идентифицированные контактные остатки включают остатки в положениях 347, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 360, 364, 366, 368, 370, 390, 392, 394, 395, 397, 399, 400, 405, 407, 409, 439 в соответствии с системой нумерации EU (табл. А).

Таблица А

Перечень остатков поверхности контакта CH3-доменов

Остаток поверхности контакта в цепи А	Контактирующие остатки в цепи В
Q347	K360
Y349	S354, D356, E357, K360
T350	S354, R355
L351	L351, P352, P353, S354, T366
S354	Y349, T350, L351
R355	T350
D356	Y349, K439
E357	Y349, K370
K360	Q347, Y349
S364	L368, K370
T366	L351, Y407
L368	S364, K409
K370	E357, S364
N390	S400
K392	L398, D399, S400, F405
T394	T394, V397, F405, Y407
P395	V397
V397	T394, P395

D399	K392, K409
S400	N390, K392
F405	K392, T394, K409
Y407	T366, T394, Y407, K409
K409	L368, D399, F405, Y407
K439	D356

Контактные остатки на поверхности контакта СНЗ-СНЗ могут представлять собой либо аминокислоты, которые являются заряженными, либо аминокислотные остатки, которые являются нейтральными. Термин "заряженный аминокислотный остаток" или "заряженный остаток", как используют в рамках изобретения, означает аминокислотные остатки с электрически заряженными боковыми цепями. Они могут представлять собой либо положительно заряженные боковые цепи, такие как цепи, присутствующие в аргинине (Arg, R), гистидине (His, H) и лизине (Lys, K), либо они могут представлять собой отрицательно заряженные боковые цепи, такие как цепи, присутствующие в аспарагиновой кислоте (Asp, D) и глутаминовой кислоте (Glu, E). Термин "нейтральный аминокислотный остаток" или нейтральный остаток, как используют в рамках изобретения, относится ко всем другим аминокислотам, которые не содержат электрически заряженных боковых цепей. Эти нейтральные остатки включают серин (Ser, S), треонин (Thr, T), аспарагин (Asn, N), глутамин (Glu, Q), цистеин (Cys, C), глицин (Gly, G), пролин (Pro, P), аланин (Ala, A), валин (Val, V), изолейцин (Ile, I), лейцин (Leu, L), метионин (Met, M), фенилаланин (Phe, F), тирозин (Tyr, Y) и триптофан (Trp, T).

Термин "поверхность контакта СНЗ-СНЗ" или "поверхность контакта", "пара СНЗ-СНЗ", "поверхность контакта доменов" или просто "поверхность контакта", как используют в рамках изобретения, относится к ассоциации между двумя СНЗ-доменами отдельных содержащих СНЗ-домен полипептидов, которая является результатом взаимодействия аминокислотных остатков, т.е. по меньшей мере одного взаимодействия между аминокислотой первого СНЗ-домена и аминокислотой второго СНЗ-домена. Такое взаимодействие осуществляется, например, посредством ван-дер-ваальсовых сил, водородных связей, опосредуемых водой водородных связей, солевых мостиков или других электростатических сил, сил притяжения между ароматическими боковыми цепями, образования дисульфидных связей или других сил, известных специалисту в данной области.

Как используют в рамках изобретения, указанные средства для преимущественного образования пары между первым и вторым содержащими СНЗ-домен полипептидами и указанными третьим и четвертым содержащими СНЗ-домен полипептидами могут представлять собой любые средства, известные в данной области. В одном варианте осуществления по меньшей мере одна молекула нуклеиновой кислоты кодирует СНЗ-домен, которые содержит в положении контактного остатка большой аминокислотный остаток (т.е. "выступ" или "выпуклость"), например, такой как R, F, Y, W, I или L, в то время как по меньшей мере одна другая молекула нуклеиновой кислоты кодирует СНЗ-домен, который содержит в положении, комплементарном контактному остатку, небольшой аминокислотный остаток (т.е. "полость" или "углубление"), например, такой как G, A, S, T или V. Полученные СНЗ-домены предпочтительно образуют пару друг с другом вследствие пространственной конформации указанных контактных аминокислот.

Технология "выступ-в-полости" более подробно описана в настоящем описании выше. В следующем варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере одна молекула нуклеиновой кислоты кодирует СНЗ-домен, который содержит в положении контактного остатка, который естественным образом заряжен, т.е. имеет естественным образом встречающиеся K, H, R, D или E, аминокислоту, которая теперь содержит противоположный заряд по сравнению с диким типом, в то время как по меньшей мере одна другая молекула нуклеиновой кислоты кодирует СНЗ-домен, который содержит в положении, комплементарном контактному остатку, который естественным образом заряжен, аминокислоту, которая теперь имеет противоположный заряд по сравнению с диким типом. Полученные сконструированные СНЗ-домены предпочтительно образуют пару друг с другом вследствие противоположных зарядов указанных контактных аминокислот, в то время как образование пар между идентичными СНЗ-доменами снижено вследствие электростатического отталкивания. В одном варианте осуществления используют мутации СНЗ, как описано в EP 01870459; WO 2009/089004; Gunasekaran et al. (2010). В одном варианте осуществления средствами преимущественного образования пар между указанными 1- и 2-м содержащими СНЗ-домен полипептидами являются аминокислотные остатки "выступа" и "полости" и средствами для преимущественного образования пар между указанными 3- и 4-м содержащими СНЗ-домен полипептидами являются аминокислоты с модифицированными способами инженерии зарядом. Предпочтительно оба из указанных средств для преимущественного образования пар между указанными 1- и 2-м содержащими СНЗ-домен полипептидами и указанными 3- и 4-м содержащими СНЗ-домен полипептидами представляют собой аминокислоты с модифицированными способами инженерии зарядом. В одном варианте осуществления различные аминокислотные остатки модифицируют способа-

ми инженерии для преимущественного образования пар между указанными 1- и 2-м содержащими СНЗ-домен полипептидами по сравнению с аминокислотными остатками, которые модифицированы способами инженерии для преимущественного образования пар между указанными 3- и 4-м содержащими СНЗ-домен полипептидами. В особенно предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере первая и вторая молекулы нуклеиновой кислоты кодируют СНЗ-домены с новыми мутациями, предусматриваемыми настоящим изобретением. Как более подробно описано в настоящем описании ниже, настоящее изобретение относится к новым мутациям СНЗ, которые обеспечивают продукцию определенных представляющих интерес биспецифических Ig-подобных молекул без существенного количества нежелательных (димерных) побочных продуктов. Настоящее изобретение также относится к новым мутациям СНЗ, которые обеспечивают продукцию определенных представляющих интерес моноспецифических Ig-подобных молекул без существенного количества нежелательных (димерных) побочных продуктов. Таким образом, является предпочтительным применение по меньшей мере одной из этих мутаций СНЗ в соответствии с настоящим изобретением.

Термин "полипептид", "полипептидная молекула" или "полипептидная цепь", как используют в рамках изобретения, относится к цепи из аминокислот, которые ковалентно связаны через пептидные связи. Белки, как правило, состоят из одной или нескольких полипептидных молекул. Один конец каждого полипептида, называемый аминоконцом или N-концом, имеет свободную аминогруппу. Другой конец со свободной карбоксильной группой называют карбоксильным концом или С-концом. Полипептиды в соответствии с настоящим изобретением могут подвергаться посттрансляционным процессам и, например, могут быть гликозилированными. Таким образом, содержащие СНЗ-домен полипептидные цепи по настоящему изобретению относятся к полипептидным цепям, которые по меньшей мере охватывают СНЗ-домен Ig и которые могут подвергаться посттрансляционным процессам модификации.

Термин "молекула нуклеиновой кислоты", как используют в рамках изобретения, определяют как молекула, содержащая цепь нуклеотидов, более предпочтительно ДНК и/или РНК. В одном варианте осуществления используют двухцепочечную РНК. В других вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты по изобретению содержит другие типы структур нуклеиновой кислоты, например, такие как спираль ДНК/РНК, пептидно-нуклеиновая кислота (PNA), замкнутая нуклеиновая кислота (LNA) и/или рибозим. Таким образом, термин "молекула нуклеиновой кислоты" также охватывает цепь, содержащую неприродные нуклеотиды, модифицированные нуклеотиды и/или нунуклеотидные структурные элементы, которые проявляют ту же функцию, что и природные нуклеотиды.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу получения клетки-хозяина для продуцирования по меньшей мере двух различных Ig-подобных молекул, причем способ включает стадию введения в указанную клетку-хозяина последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих по меньшей мере первую, вторую, третью и четвертую содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь, где по меньшей мере две из указанных последовательностей нуклеиновой кислоты предоставлены со средствами для преимущественного образования пар между указанными первым и вторым содержащими СНЗ-домен полипептидами и указанными третьим и четвертым содержащими СНЗ-домен полипептидами, где указанные последовательности нуклеиновой кислоты вводят последовательно или одновременно.

Следующим аспектом настоящего изобретения является предоставление способа получения клетки-хозяина для продуцирования гетеродимерной Ig-подобной молекулы, причем способ включает стадию введения в указанную клетку-хозяина последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих по меньшей мере первую и вторую содержащую СНЗ-домен полипептидные цепи, где указанная содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит по меньшей мере одну замену нейтрального аминокислотного остатка на положительно заряженный аминокислотный остаток и где указанная вторая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит по меньшей мере одну замену нейтрального аминокислотного остатка на отрицательно заряженный аминокислотный остаток, где указанные последовательности нуклеиновой кислоты вводят последовательно или одновременно. Указанные способы получения указанных клеток-хозяев предпочтительно дополнительно включают стадию введения в указанную клетку-хозяина последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей общую легкую цепь.

Также в настоящем описании предусматривается рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие по меньшей мере первую, вторую, третью и четвертую содержащую СНЗ-домен полипептидные цепи, где по меньшей мере две из указанных молекул нуклеиновой кислоты предоставлены со средствами для преимущественного образования пар между указанными первым и вторым содержащими СНЗ-домен полипептидами и указанными третьим и четвертым содержащими СНЗ-домен полипептидами.

Более того, изобретение относится к рекомбинантной клетке-хозяину, содержащей последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие по меньшей мере первую и вторую содержащую СНЗ-домен полипептидные цепи, где указанная первая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит по меньшей мере одну замену нейтрального аминокислотного остатка на положительно заряженный аминокислотный остаток, и где указанная вторая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит по меньшей мере одну замену нейтрального аминокислотного остатка на отрицательно заряженный аминокислотный остаток.

Рекомбинантная клетка-хозяин по изобретению предпочтительно дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую общую легкую цепь.

"Клетка-хозяин" по изобретению может представлять собой любую клетку-хозяина, способную экспрессировать рекомбинантные молекулы ДНК, включая бактерии, например такие, как *Escherichia* (например *E. coli*), *Enterobacter*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, дрожжи, такие как *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *P. pastoris*, *Candida* или *Yarrowia*, нитчатые грибы, такие как *Neurospora*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans* и *Aspergillus niger*, клетки насекомых, такие как клетки SF-9 или SF-21 *Spodoptera frugiperda*, и предпочтительно клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки ВНК, клетки мыши, включающие клетки SP2/0 и клетки миеломы NS-0, клетки приматов, такие как клетки COS и Vero, клетки MDCK, клетки BRL 3A, гибридомы, опухолевые клетки, иммортализованные первичные клетки, клетки человека, такие как W138, HepG2, HeLa, HEK293, HT1080, или клетки сетчатки эмбриона, такие как PER.C6 и т.п. Часто, предпочтительная для выбора экспрессирующая система вовлекает экспрессирующий вектор для клеток млекопитающих и хозяина, так что антитела могут быть соответствующим образом гликозилированными. Линию клеток человека, предпочтительно PER.C6, можно преимущественно использовать для получения антител с полностью человеческим профилем гликозилирования. Условия для выращивания или увеличения клеток в количестве (см. например *Tissue Culture*, Academic Press, Kruse and Paterson, editors (1973)) и условия для экспрессии рекомбинантного продукта могут в некоторой степени отличаться, и обычно проводят оптимизацию процесса для увеличения соотношений продуктов и/или выращивания одних клеток относительно других, в соответствии со способами, общеизвестными специалистам в данной области. Как правило, принципы, протоколы и практические технологии для максимизации продуктивности культур клеток млекопитающих могут быть найдены в *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach* (M. Butler, ed., IRL Press, 1991). Экспрессия антител в рекомбинантных клетках-хозяевах подробно описана в данной области (см., например, EP 0120694; EP 0314161; EP 0481790; EP 0523949; патент США 4816567; WO 00/63403). Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие легкие и тяжелые цепи, могут присутствовать в качестве внехромосомных копий и/или могут стабильно встраиваться в хромосому клетки-хозяина, причем последнее является предпочтительным.

Следующим аспектом настоящего изобретения является предоставление культуры рекомбинантных клеток-хозяев по изобретению или культуры рекомбинантных клеток, получаемых или полученных способом по изобретению, причем указанная культура продуцирует либо по меньшей мере две различных Ig-подобных молекулы, либо гетеродимерную Ig-подобную молекулу.

Специалистам в данной области хорошо известно, что для обеспечения экспрессии последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих содержащие СНЗ-домен полипептиды, с последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими содержащие СНЗ-домен полипептиды могут быть функционально связаны последовательности, способные запускать такую экспрессию. "Функционально связанный" означает, что последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие содержащие СНЗ-домен полипептиды или их предшественники, связаны с последовательностями, способными запускать экспрессию, так чтобы эти последовательности могли запускать экспрессию содержащих СНЗ-домен полипептидов или их предшественников. Пригодные экспрессирующие векторы доступны в данной области, например, вектор серии pcDNA от Invitrogen. Когда последовательность, кодирующая представляющий интерес полипептид, надлежащим образом встроена относительно последовательностей, контролирующих транскрипцию и трансляцию кодируемого полипептида, полученная экспрессирующая кассета является пригодной для продукции представляющего интерес полипептида, которую упоминают как экспрессия.

Последовательности, контролирующие экспрессию, могут включать промоторы, энхансеры и т.п., их комбинации. Они должны быть способны функционировать в клетке-хозяине, тем самым контролируя экспрессию последовательностей нуклеиновой кислоты, которые функционально связаны с ними. Промоторы могут быть конститутивными или регулируемые, и они могут быть получены из различных источников, включая вирусы, прокариотические или эукариотические источники, и они могут быть искусственно сконструированными. Экспрессия представляющих интерес нуклеиновых кислот может осуществляться с естественного промотора или его производного или с полностью гетерологичного для них промотора. Некоторые хорошо известные и широко используемые промоторы для экспрессии в эукариотических клетках включают промоторы, происходящие из вирусов, таких как аденовирус, например промотор E1A, промоторы, происходящие из цитомегаловируса (CMV), такие как предранний промотор CMV (IE), промоторы, происходящие из вируса обезьян 40 (SV40), и т.п.

Пригодные промоторы также могут происходить из эукариотических клеток, такие как промоторы металлотионеина (MT), промотор фактора элонгации 1 α (EF-1 α), промотор актина, промотор иммуноглобулина, промоторы теплового шока и т.п. В рамках настоящего изобретения является пригодным любой промотор энхансер/промотор, способные контролировать экспрессию представляющей интерес последовательности в клетке-хозяине. В одном варианте осуществления последовательность, способная контролировать экспрессию, содержит область из промотора CMV, предпочтительно область, содержащую нуклеотиды с -735 по +95 предраннего энхансера/промотора генов CMV. Квалифицированному специалисту будет известно, что последовательности для экспрессии, используемые в рамках изобре-

ния, можно пригодным образом комбинировать с элементами, которые могут стабилизировать или усиливать экспрессию, такими как инсуляторы, участки прикрепления к матриксу, элементы STAR (WO 03/004704) и т.п. Это может повышать стабильность и/или уровни экспрессии.

Производство белков в рекомбинантных клетках-хозяевах широко описано, например, в *Current Protocols in Protein Science*, 1995, Coligan J.E., Dunn B.M., Ploegh H.L., Speicher D.W., Wingfield P.T., ISBN 0-471-11184-8; Bendig, 1988. Культивирование клетки проводят для обеспечения ее метаболизма, и/или роста, и/или деления и/или для получения представляющих интерес рекомбинантных белков. Это можно осуществлять способами, хорошо известными специалистам в данной области, и они включают, но не ограничиваются ими, предоставление клетке питательных веществ. Способы включают выращивание прикрепленных на поверхности культур, выращивание в суспензии или их комбинацию. Несколько условий культивирования можно оптимизировать способами, хорошо известными в данной области, для оптимизации выхода белковых продуктов. Культивирование можно проводить, например, в чашках, вращающихся флаконах или в биореакторах, с использованием периодических систем, периодических систем с подпиткой, непрерывных систем, полых волокон и т.п. Для обеспечения крупномасштабной (непрерывной) продукции рекомбинантных белков посредством культивирования клеток в данной области предпочтительны клетки, способные расти в суспензии, и являются предпочтительными клетки, которые могут культивироваться в отсутствие происходящей из животных или человека сыворотки или происходящих из человека компонентов сыворотки. Таким образом, очистка упрощается и безопасность увеличивается вследствие отсутствия дополнительных белков животных или человека, происходящих из культуральной среды, в то время как система также является очень надежной, поскольку воспроизводимость в синтетических средах является наивысшей.

Ig-подобные молекулы экспрессируются в клетках-хозяевах и их собирают из клеток или предпочтительно из клеточной культуральной среды способами, общеизвестными специалистам в данной области. После сбора эти Ig-подобные молекулы можно очищать с использованием способов, известных в данной области. Такие способы могут включать преципитацию, центрифугирование, фильтрацию, эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию, катионообменную и/или анионообменную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия и т.п. Для смеси антител, содержащей молекулы IgG, является пригодной аффинная хроматография с белком А или белком G (см., например, патенты США 4801687 и 5151504).

Ig-подобные молекулы и/или их смеси, полученные способами в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно имеют общую легкую цепь. Таким образом, дополнительно предусматривается способ по изобретению, далее включающий предоставление указанной клетке-хозяину молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей общую легкую цепь. Она представляет собой легкую цепь, которая способна образовывать пару по меньшей мере с двумя различными тяжелыми цепями, тем самым образуя функциональные антигенсвязывающие домены. Функциональный антигенсвязывающий домен способен специфически связываться с антигеном. Предпочтительно используют общую легкую цепь, которая способна образовывать пару со всеми тяжелыми цепями, полученными способами по изобретению, тем самым образуя функциональные антигенсвязывающие домены так, чтобы предотвратилось неправильное спаривание несоответствующих тяжелых и легких цепей. В одном аспекте используют только общие легкие цепи с одной идентичной аминокислотной последовательностью. Альтернативно специалистам в данной области будет понятно, что "общий" также относится к функциональным эквивалентам легкой цепи, аминокислотная последовательность которых не является идентичной. Существует множество вариантов указанной легкой цепи, где присутствуют мутации (делеции, замены, вставки), которые не оказывают существенного влияния на образование функциональных связывающих областей. Таким образом, такие варианты также способны связывать различные тяжелые цепи и образовывать функциональные антигенсвязывающие домены. Термин "общая легкая цепь", как используют в рамках изобретения, таким образом, относится к легким цепям, которые могут быть идентичными или имеют некоторые отличия в аминокислотной последовательности при сохранении специфичности связывания полученного антитела после образования пары с тяжелой цепью. Например, можно получить или найти легкие цепи, которые не являются идентичными, но тем не менее являются функционально эквивалентными, например, вследствие внесения и исследования консервативных аминокислотных замен и/или замен аминокислот в областях, которые не вносят вклада или только частично вносят вклад в специфичность связывания, когда они спарены с тяжелой цепью и т.п. Комбинация определенной общей легкой цепи и таких функционально эквивалентных вариантов охватывается термином "общая легкая цепь". См. WO 2004/009618 для подробного описания применения общих легких цепей. Предпочтительно в рамках настоящего изобретения используют общую легкую цепь, которая представляет собой легкую цепь, подобную легкой цепи эмбрионального типа, более предпочтительно легкую цепь эмбрионального типа, предпочтительно реаранжированную легкую цепь каппа эмбрионального типа, наиболее предпочтительно реаранжированную легкую цепь каппа человека эмбрионального типа либо IgVκ1-39/Jκ, либо IG Vκ3-20/Jκ.

Альтернативно квалифицированный специалист может выбрать, в качестве альтернативы использованию общей легкой цепи и для предотвращения неправильного спаривания несоответствующих тяжелых и легких цепей, средства для вынужденного образования пар между тяжелой и легкой цепью, на-

пример, таких как средства, описанные в WO 2009/080251; WO 2009/080252; и/или WO 2009/080253.

Настоящее изобретение относится к новым сконструированным СНЗ-доменам, а также к новым комбинациям мутаций СНЗ. До настоящего изобретения заряженные контактные аминокислоты СНЗ-доменов, о которых было известно, что они вовлечены в образование пар СНЗ-СНЗ, заменяли аминокислотами противоположного заряда (обращение заряда), тем самым влияя на образование пар СНЗ-СНЗ. Мутации в соответствии с настоящим изобретением являются оригинальной альтернативной этому подходу, поскольку теперь аминокислоты СНЗ, которые являются незаряженными или нейтральными в СНЗ дикого типа, заменены заряженными остатками. В этом варианте осуществления в рамках настоящего изобретения не происходит замены контактных аминокислот на аминокислоты противоположного заряда, а происходит замена незаряженных аминокислот СНЗ на заряженные аминокислоты. Этот подход по настоящему изобретению обеспечивает не только способ эффективного управления димеризацией доменов СНЗ, но также он имеет преимущество, состоящее в том, что создается по меньшей мере одно дополнительное заряд-зарядовое взаимодействие на поверхности контакта СНЗ. Ввиду этого дополнительного заряд-зарядового взаимодействия помимо существующих зарядовых пар на поверхности контакта СНЗ-СНЗ, димеры по изобретению, как правило, являются более стабильными по сравнению с димерами дикого типа (димер дикого типа определяют как биспецифический IgG (AB) без модификации способами инженерии СНЗ в противоположность его родительским гомодимерам (AA или BB)). Более того, неожиданно стало возможным еще большее увеличение доли одной или нескольких представляющих интерес Ig-подобных молекул в смеси. Как описано в настоящем описании выше, способы, известные в данной области, для преимущественного продуцирования биспецифического антитела, как правило, вовлекают продукцию некоторых нежелательных димерных побочных продуктов. Например, доля представляющего интерес биспецифического антитела при использовании технологии "выступ-в-полости" составляет по меньшей мере 87%, в то время как подход электростатической инженерии, где заряженные контактные молекулы заменяют аминокислотами противоположного заряда, также приводит к долям вплоть до 96% (см., например, пример 11). Совершенно неожиданно, авторы настоящего изобретения успешно внесли мутации, которые далее повышают долю представляющей интерес Ig-подобной молекулы в смеси. Например, в примере 17 описан способ с использованием мутаций в соответствии с настоящим изобретением, где доля представляющего интерес биспецифического антитела была увеличена так, чтобы димерный побочный продукт совсем не поддавался обнаружению в полученной смеси. Неспаренные половинные молекулы, состоящие только из единичной тяжелой цепи, спаренной с общей легкой цепью, присутствовали в смеси в некоторой степени, однако они являются результатом несбалансированной экспрессии тяжелых цепей и могут быть без труда отделены от смеси эксклюзионной хроматографией. Таким образом, с помощью таких мутаций в соответствии с настоящим изобретением можно обеспечивать высокую долю биспецифической Ig-подобной молекулы в одной клетке по существу без примесей димерных побочных продуктов, что является особенно пригодным для изготовления фармацевтической композиции.

Таким образом, один предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к способу получения гетеродимерной Ig-подобной молекулы из одной клетки, где указанная Ig-подобная молекула содержит два СНЗ-домена, которые способны образовывать поверхность контакта, причем указанный способ включает предоставление в указанной клетке

первой молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей 1-ю содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь; и

второй молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей 2-ю содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь,

где указанная первая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит по меньшей мере одну замену нейтрального аминокислотного остатка положительно заряженным аминокислотным остатком и где указанная вторая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит по меньшей мере одну замену нейтрального аминокислотного остатка отрицательно заряженным аминокислотным остатком, причем указанный способ дополнительно включает стадии культивирования указанной клетки-хозяина, и обеспечения экспрессии указанных двух молекул нуклеиновой кислоты, и сбора указанной гетеродимерной Ig-подобной молекулы из культуры.

Указанный способ предпочтительно дополнительно включает стадию предоставления указанной клетки-хозяина с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей общую легкую цепь, которая имеет преимущества, как описано в настоящем описании выше.

Было описано, что аминокислоты в положении 366 одного СНЗ-домена и в положении 351 второго СНЗ-домена представляют собой пару контактных остатков на поверхности контакта СНЗ-СНЗ, что означает, что они расположены достаточно близко друг к другу в трехмерной конформации полученной Ig-подобной молекулы, чтобы они были способны взаимодействовать друг с другом. Таким образом, первый СНЗ-домен предпочтительно будет образовывать пару со вторым СНЗ-доменом.

В одном варианте осуществления треонин (Т) в положении 366 первого СНЗ-домена заменен первой заряженной аминокислотой, и лейцин (L) в положении 351 второго СНЗ-домена заменен второй заряженной аминокислотой, где указанные первая и вторая заряженные кислоты имеют противоположный

заряд. Если первый содержащий СНЗ-домен полипептид, который содержит заряженный остаток в положении 366, дополнительно содержит переменный домен, который обладает специфичностью к антигену А, и если второй содержащий СНЗ-домен полипептид, который содержит положительно заряженный остаток в положении 351, дополнительно содержит переменный домен, который обладает специфичностью к антигену В, в основном будут образовываться биспецифические Ig-подобные молекулы со специфичностью к АВ. Таким образом, дополнительно предусматривается способ в соответствии с настоящим изобретением, где указанное средство для предпочтительного образования пар между указанными 1- и 2-м содержащими СНЗ-домен полипептидами, или указанное средство для преимущественного образования пар между указанными 3- и 4-м содержащими СНЗ-домен полипептидами является заменой треонина в положении 366 указанного 1- или 3-го СНЗ-домена первой заряженной аминокислотой и заменой лейцина в положении 351 указанного 2- или 4-го СНЗ-домена второй заряженной аминокислотой, где указанные первая и вторая заряженные аминокислоты имеют противоположный заряд.

Одной предпочтительной комбинацией мутаций в соответствии с настоящим изобретением является замена треонина (Т) лизином (К) в положении 366 первого содержащего СНЗ-домен полипептида, который дополнительно содержит переменный домен (например, со специфичностью А), и замена лейцина (L) аспарагиновой кислотой (D) в положении 351 второго содержащего СНЗ-домен полипептида, который дополнительно содержит переменный домен (например, со специфичностью В). Это обозначают как парную мутацию Т366К/Л351D. Как объяснено выше, сообщалось, что аминокислоты в положении 366 одного СНЗ-домена и в положении 351 второго СНЗ-домена являются парой контактных остатков на поверхности контакта СНЗ-СНЗ. Лизин, который внесен в положение 366, и аспарагиновая кислота, внесенная в положение 351, имеют противоположные заряды, так что эти аминокислоты электростатически притягиваются друг к другу. Таким образом, первый СНЗ-домен предпочтительно притягивает второй СНЗ-домен, и преимущественно образуются Ig-подобные молекулы, содержащие первый СНЗ-домен, содержащий лизин в положении 366, спаренный со вторым СНЗ-доменом, содержащим аспарагиновую кислоту в положении 351. Если первый содержащий СНЗ-домен полипептид обладает специфичностью к антигену А и если второй содержащий СНЗ-домен полипептид обладает специфичностью к антигену В, преимущественно образуются биспецифические Ig-подобные молекулы со специфичностью "АВ". Следует отметить, что в некоторых вариантах осуществления специфичность переменных доменов как указанной первой, так и указанной второй содержащих СНЗ-домен полипептидных цепей может быть одинаковой, что приводит к образованию моноспецифических Ig-подобных молекул (например, со специфичностью "АА"). Как упоминалось выше, одним из преимуществ мутаций в соответствии с настоящим изобретением является тот факт, что обеспечивается новое взаимодействие между вновь внесенной парой заряженных аминокислот вместо замены существующих взаимодействий заряженных аминокислот. Это ранее не было описано или предложено. Таким образом, один аспект изобретения предусматривает способ в соответствии с настоящим изобретением для получения по меньшей мере двух различных Ig-подобных молекул из одной клетки-хозяина, где указанная 1-я содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит аминокислотную замену Т366К, и указанная 2-я содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит аминокислотную замену Л351D. Один вариант осуществления относится к способу получения гетеродимерной Ig-подобной молекулы из единичной клетки, где указанная Ig-подобная молекула содержит два СНЗ-домена, которые способны образовывать поверхность контакта, причем указанный способ включает предоставление в указанной клетке

первой молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей 1-ю содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь; и

второй молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей 2-ю содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь,

где указанная первая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит аминокислотную замену Т366К и где указанная вторая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит аминокислотную замену Л351D, причем указанный способ дополнительно включает стадии культивирования указанной клетки-хозяина, и обеспечения экспрессии указанных двух молекул нуклеиновой кислоты, и сбора указанной гетеродимерной Ig-подобной молекулы из культуры.

С использованием упомянутых выше аминокислотных замен по настоящему изобретению, стало возможным продуцировать гетеродимерную Ig-подобную молекулу из единичной клетки, где присутствие примесей гомодимеров составляет менее 5%, предпочтительно менее 2%, более предпочтительно менее 1% или наиболее предпочтительно где примеси гомодимеров по существу отсутствуют. Таким образом, в одном варианте осуществления предусматривается способ получения гетеродимерной Ig-подобной молекулы из единичной клетки, где указанная Ig-подобная молекула содержит два СНЗ-домена, которые способны образовывать поверхность контакта, и где присутствие примесей гомодимеров составляет менее 5%, предпочтительно менее 2%, более предпочтительно менее 1% и наиболее предпочтительно примеси гомодимеров по существу отсутствуют, причем указанный способ включает предоставление в указанной клетке

первой молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей 1-ю содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь; и

второй молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей 2-ю содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь,

где указанная первая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит аминокислотную замену Т366К и где указанная вторая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит аминокислотную замену L351D, причем указанный способ дополнительно включает стадии культивирования указанной клетки-хозяина, и обеспечения экспрессии указанных двух молекул нуклеиновой кислоты, и сбора указанной гетеродимерной Ig-подобной молекулы из культуры.

Предпочтительно предусматривается способ в соответствии с настоящим изобретением для получения по меньшей мере двух различных Ig-подобных молекул, или способ в соответствии с изобретением для получения гетеродимерной Ig-подобной молекулы, где указанная первая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь дополнительно содержит аминокислотную замену L351K. Кроме того, предпочтительно, чтобы указанная вторая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь дополнительно содержала аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из Y349E, Y349D и L368E. Наиболее предпочтительно, указанная вторая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь дополнительно содержит аминокислотную замену L368E.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления упомянутые выше мутации Т366К/L351'D в соответствии с настоящим изобретением далее комбинируют с заменой лейцина (L) на глутаминовую кислоту (E) в положении 368 второго СНЗ-домена. Ее, например, обозначают как мутация Т366К/L351'D,L368'E (однако также возможны альтернативные способы обозначения, такие как Т336К/L351D-L368E или Т366К/L351D, L368E или Т366К - L351D,L368E). Как показано в примере 17, внесение этой мутации в соответствии с изобретением в первый содержащий СНЗ-домен полипептид со специфичностью к антигену А, и второй содержащий СНЗ-домен полипептид со специфичностью к антигену В приводит к особенно высокой доле биспецифических Ig-подобных молекул с двойной специфичностью к АВ. С помощью этой пары мутаций стало возможным получение биспецифического антигена без какого-либо подающегося обнаружению количества образовавшихся гомодимеров. Таким образом, особенно предпочтительный вариант осуществления относится к способу получения гетеродимерной Ig-подобной молекулы из единичной клетки, где указанная Ig-подобная молекула содержит два СНЗ-домена, которые способны образовывать поверхность контакта, и где присутствие примесей гомодимеров составляет менее 5%, предпочтительно менее 2%, более предпочтительно менее 1% и наиболее предпочтительно примеси гомодимеров по существу отсутствуют, причем указанный способ включает предоставление в указанной клетке

первой молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей 1-ю содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь; и

второй молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей 2-ю содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь,

где указанная первая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит аминокислотную замену Т366К и где указанная вторая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит аминокислотные замены L351D и L368E, причем указанный способ дополнительно включает стадии культивирования указанной клетки-хозяина, и обеспечения экспрессии указанных двух молекул нуклеиновой кислоты, и сбора указанной гетеродимерной Ig-подобной молекулы из культуры.

В другом предпочтительном варианте осуществления треонин (Т) заменен лизином (К) в положении 366 первого СНЗ-домена и лейцин (L) заменен аспарагиновой кислотой (D) в положении 351 второго СНЗ-домена, и тирозин (Y) заменен глутаминовой кислотой (E) в положении 349 указанного второго СНЗ-домена. Это, например, обозначают как мутация Т366К/L351'D,Y349'E, однако другие способы обозначения этих мутаций могут включать, например, Т366К - L351D:Y349E, или Т366К/L351D,Y349E или просто Т366К/L351DY349E. Остаток Y349 является соседним остатком для остатка в положении 351, который может участвовать во взаимодействиях димеров. В соответствии с данными *in silico*, Y349E способствует стабильности гетеродимера (более низкие показатели *in silico*), а также дестабилизации монодимера (более высокие показатели *in silico*) и глутаминовая кислота (E) в положении 349 является более благоприятной, чем аспарагиновая кислота (D). Таким образом, внесение второй аминокислотной замены во второй содержащий СНЗ-домен полипептид, уже содержащий аминокислотную замену в положении 351, далее способствует гетеродимеризации.

Особенно предпочтительный вариант осуществления, таким образом, относится к способу получения гетеродимерной Ig-подобной молекулы из единичной клетки, где указанная Ig-подобная молекула содержит два СНЗ-домена, которые способны образовывать поверхность контакта, и где примеси гомодимеров составляют менее 5%, более предпочтительно менее 2%, еще более предпочтительно менее 1%, и наиболее предпочтительно по существу отсутствуют, причем указанный способ включает предоставление в указанной клетке

первой молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей 1-ую содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь; и

второй молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей 2-ую содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь,

где указанная первая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит аминокислотную замену Т366К и где указанная вторая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит аминокислотные замены L351D и Y349E, причем указанный способ дополнительно включает стадии культивирования указанной клетки-хозяина, и обеспечения экспрессии указанных двух молекул нуклеиновой кислоты, и сбора указанной гетеродимерной Ig-подобной молекулы из культуры.

В другом предпочтительном варианте осуществления треонин (Т) заменен лизином (К) в положении 366 первого СНЗ-домена и лейцин (L) заменен аспарагиновой кислотой (D) в положении 351 второго СНЗ-домена, и тирозин (Y) заменен глутаминовой кислотой (E) в положении 349 указанного второго СНЗ-домена, и лейцин (L) заменен глутаминовой кислотой (E) в положении 368 указанного второго СНЗ-домена. Это обозначают как мутация Т366К/L351'D,Y349'E,L368'E. Два остатка Y349 и L368 представляют собой остатки, которые могут участвовать во взаимодействиях димеров. В соответствии с данными *in silico*, Y349E и L368E способствуют стабильности гетеродимера (более низкие показатели *in silico*), а также дестабилизации димера ВВ (более высокие показатели *in silico*), и глутаминовая кислота (E) в положениях 349 и 368 является более благоприятной, чем аспарагиновая кислота (D). Таким образом, внесение второй и третьей аминокислотной замены в В-цепь, которая уже содержит аминокислотную замену в положении 351, далее способствует гетеродимеризации. Таким образом, особенно предпочтительный вариант осуществления относится к способу получения гетеродимерной Ig-подобной молекулы из единичной клетки, где указанная Ig-подобная молекула содержит два СНЗ-домена, которые способны образовывать поверхность контакта и где примеси гомодимеров составляют менее 5%, более предпочтительно менее 2%, еще более предпочтительно менее 1%, и наиболее предпочтительно по существу отсутствуют, причем указанный способ включает предоставление в указанной клетке

первой молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей 1-ю содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь; и

второй молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей 2-ю содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь,

где указанная первая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит аминокислотную замену Т366К и где указанная вторая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит аминокислотные замены L351D, и Y349E, и L368E, причем указанный способ дополнительно включает стадии культивирования указанной клетки-хозяина, и обеспечения экспрессии указанных двух молекул нуклеиновой кислоты, и сбора указанной гетеродимерной Ig-подобной молекулы из культуры.

В другом предпочтительном варианте осуществления треонин (Т) заменен лизином (К) в положении 366 первого СНЗ-домена, и лейцин (L) заменен лизином (К) в положении 351 указанного первого СНЗ-домена, и лейцин (L) заменен аспарагиновой кислотой (D) в положении 351 второго СНЗ-домена, и лейцин (L) заменен глутаминовой кислотой (E) в положении 368 указанного второго СНЗ-домена. Это обозначают как мутация Т366К,L351K/L351'D,L368'E. Эта мутация также увеличивает долю представляющего интерес (биспецифического) антитела, как показано в разделе "Примеры". Также с помощью этой мутации стало возможным получение биспецифического антитела без образования какого-либо подающего обнаружению количества гомодимеров. Таким образом, дополнительно предусматривается способ получения гетеродимерной Ig-подобной молекулы из единичной клетки, где указанная Ig-подобная молекула содержит два СНЗ-домена, которые способны образовывать поверхность контакта, и где примеси гомодимеров составляют менее 5%, предпочтительно менее 2%, более предпочтительно менее 1% и наиболее предпочтительно по существу отсутствуют, причем указанный способ включает предоставление в указанной клетке

первой молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей 1-ю содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь; и

второй молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей 2-ю содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь,

где указанная первая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит аминокислотную замену Т366К и где указанная вторая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит аминокислотные замены L351D и L368E, причем указанный способ дополнительно включает стадии культивирования указанной клетки-хозяина, и обеспечения экспрессии указанных двух молекул нуклеиновой кислоты, и сбора указанной гетеродимерной Ig-подобной молекулы из культуры.

В другом предпочтительном варианте осуществления треонин (Т) заменен на лизин (К) в положении 366 первого СНЗ-домена, и лейцин (L) заменен лизином (К) в положении 351 указанного первого СНЗ-домена, и лейцин (L) заменен аспарагиновой кислотой (D) в положении 351 второго СНЗ-домена, и тирозин (Y) заменен аспарагиновой кислотой (D) в положении 349 указанного второго СНЗ-домена, и аргинин (R) заменен аспарагиновой кислотой (D) в положении 355 указанного второго СНЗ-домена. Это обозначают как мутация Т366К,L351K/L351'D,Y349'D,R355'D. Пара Т366К-L351K/L351'D-Y349'D может быть далее улучшена посредством мутации R355'D в В-цепи, что приводит к более высокому показателю ВВ *in silico*, но также показатель АВ *in silico* является несколько более высоким. Таким образом, дополнительно предусматривается способ получения гетеродимерной Ig-подобной молекулы из единичной клетки, где указанная Ig-подобная молекула содержит два СНЗ-домена, которые способны образо-

вывать поверхность контакта, и где примеси гомодимеров составляют менее 5%, более предпочтительно менее 2%, еще более предпочтительно менее 1%, и наиболее предпочтительно по существу отсутствуют, причем указанный способ включает предоставление в указанной клетке

первой молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей 1-ю содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь; и

второй молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей 2-ю содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь,

где указанная первая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит аминокислотные замены Т366К и L351К, и где указанная вторая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит аминокислотные замены L351D, и Y349D, и R355D, причем указанный способ дополнительно включает стадии культивирования указанной клетки-хозяина, и обеспечения экспрессии указанных двух молекул нуклеиновой кислоты, и сбора указанной гетеродимерной Ig-подобной молекулы из культуры.

В табл. В предоставлен обзор мутаций, которые можно вносить в СНЗ-домены в качестве предпочтительных средств для преимущественного образования пар, чтобы получить либо гетеродимеры, либо гомодимеры.

Таблица В

Замены АА в СНЗ	Конструкция #	Предпочтительно образует пары с
- (дикий тип)	-	Дикий тип
E356K, D399K	1	Конструкция 2 или 3
K392D, K409D	2	Конструкция 1
K392D, K409D, K439D	3	Конструкция 1
K392D, D399K, K409D	4	Конструкция 4
E356K, E357K, K439D, K370D	5	Конструкция 5
T366W	6	Конструкция 7
T366S, L368A, Y407V	7	Конструкция 6
T366K	43	Конструкция 63, 69, 70, 71, 73
L351D	63	Конструкция 43, 68
T366K, L351K	68	Конструкция 63, 69, 70, 71, 72, 75
L351D, L368E	69	Конструкция 43, 68
L351E, Y349E	70	Конструкция 43, 68
L351D, Y349E	71	Конструкция 43, 68
L351D, R355D	72	Конструкция 43, 68
L351D, Y349E, L368E	73	Конструкция 43
L351D, Y349D, R355D	75	Конструкция 68

Таким образом, также предусматривается способ в соответствии с настоящим изобретением для получения по меньшей мере двух различных Ig-подобных молекул, или способ в соответствии с изобретением для получения гетеродимерной Ig-подобной молекулы, где указанные средства для преимущественного образования пар между указанными 1- и 2-м содержащими СНЗ-домен полипептидами, и/или указанные средства для преимущественного образования пар между указанными 3- и 4-м содержащими СНЗ-домен полипептидами содержат по меньшей мере одну комбинацию мутаций, как представлено в табл. В. Предпочтительно указанные средства для преимущественного образования пар между указанными 1- и 2-м содержащими СНЗ-домен полипептидами и указанные средства для преимущественного образования пар между указанными 3- и 4-м содержащими СНЗ-домен полипептидами содержат по меньшей мере две комбинации мутаций, как представлено в табл. В.

Настоящее изобретение также относится к новым комбинациям мутаций СНЗ, с которыми стало возможным получить смесь по меньшей мере двух моноспецифических Ig-подобных молекул в единичной клетке, где примеси биспецифических Ig-подобных молекул составляют менее 5%, предпочтительно не более чем 2%, еще более предпочтительно менее 1% и наиболее предпочтительно по существу отсутствуют. Эти мутации в соответствии с изобретением, таким образом, являются особенно пригодными для получения смеси моноспецифических антител, которая, например, является преимущественной, когда

является желательным высокий уровень сшивания двух идентичных молекул-мишеней, когда плотность антител на клетках-мишенях должна быть достаточно высокой, чтобы привлечь определенные эффекторные функции, такие как опосредуемый комплементом лизис опухолевой клетки, или когда две мишени расположены слишком далеко друг от друга, так что они не могут связываться одним биспецифическим антителом, или для упрощения процедур получения разрешения контролирующего органа. В таких случаях часто является желательной оптимизация производственной платформы для таких моноспецифических антител. Как показано в примере 10, настоящее изобретение относится к наблюдению, что, когда лизин (К) в положении 392 первого содержащего СНЗ-домен полипептида (например, обладающего специфичностью А) заменен аспарагиновой кислотой (D), и когда аспарагиновая кислота (D) в положении 399 указанного первого содержащего СНЗ-домен полипептида заменена лизином (К), и когда лизин (К) в положении 409 указанного первого содержащего СНЗ-домен полипептида заменен аспарагиновой кислотой (D), стало возможным получение смеси по меньшей мере двух различных моноспецифических Ig-подобных молекул в одной клетке, включая моноспецифические Ig-подобные молекулы со специфичностью AA, где образование биспецифических побочных продуктов (биспецифические Ig-подобные молекулы) снижено до уровня ниже 5%, или даже до уровня ниже 3%, или даже по существу совсем не обнаруживается. Таким образом, упомянутая выше комбинация мутаций (обозначаемая в настоящем описании как K392D, D399K, K409D) является особенно предпочтительной для получения смеси моноспецифических Ig-подобных молекул. Квалифицированному специалисту будет понятно, что их функциональные варианты, т.е. K392E, D399R, K409E, могут приводить к сходным эффектам. Кроме того, также к сходным эффектам могут приводить двойные мутанты, содержащие замены D399K и K409D, или другие функциональные варианты, например, такие как K392D и K409D, D399R и K409E и т.д.

Вышеуказанное справедливо для комбинации мутаций, где глутаминовая кислота (E) в положении 356 первого содержащего СНЗ-домен полипептида заменена лизином (К), и где глутаминовая кислота (E) в положении 357 указанного первого содержащего СНЗ-домен полипептида заменена лизином (К), и где лизин (К) в положении 439 указанного первого содержащего СНЗ-домен полипептида заменен аспарагиновой кислотой (D), и где лизин (К) в положении 370 указанного первого содержащего СНЗ-домен полипептида заменен аспарагиновой кислотой (D). Эта комбинация мутаций (обозначаемая в настоящем описании как E356K, E357K, K439D, K370D) также является особенно предпочтительной для получения смеси моноспецифических Ig-подобных молекул. Квалифицированному специалисту будет понятно, что их функциональные варианты, т.е. E356R, E357R, K439E, K370E, могут приводить к сходным эффектам. Кроме того, также к сходным эффектам могут приводить тройные или двойные мутанты, содержащие замены E356K и K439D, и E357K и K370D, или другие функциональные варианты. Таким образом, следующий вариант осуществления относится к способу получения по меньшей мере двух различных моноспецифических Ig-подобных молекул из одной клетки-хозяина, где каждая из указанных двух Ig-подобных молекул содержит два СНЗ-домена, которые способны образовывать поверхность контакта, причем указанный способ включает предоставление в указанной клетке

первой молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей 1-ю содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь, обладающую специфичностью А; и

второй молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей 2-ю содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь, обладающую специфичностью В,

где указанная первая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит мутации K392D, D399K, K409D, и указанная вторая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь либо содержит СНЗ-домен дикого типа, либо содержит мутацию E356K, E357K, K439D, K370D, причем указанный способ дополнительно включает стадии культивирования указанной клетки-хозяина, и обеспечения экспрессии указанных молекул нуклеиновой кислоты, и сбора указанных по меньшей мере двух различных Ig-подобных молекул из культуры.

Альтернативный вариант осуществления относится к способу получения по меньшей мере двух различных моноспецифических Ig-подобных молекул из одной клетки-хозяина, где каждая из указанных двух Ig-подобных молекул содержит два СНЗ-домена, которые способны образовывать поверхность контакта, причем указанный способ включает предоставление в указанной клетке

первой молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей 1-ю содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь, обладающую специфичностью А; и

второй молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей 2-ю содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь, обладающую специфичностью В,

где указанная первая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь либо содержит СНЗ-домен дикого типа, либо содержит мутацию K392D, D399K, K409D, и указанная вторая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит мутацию E356K, E357K, K439D, K370D, причем указанный способ дополнительно включает стадии культивирования клетки-хозяина, и обеспечения экспрессии указанных молекул нуклеиновой кислоты, и сбора указанных по меньшей мере двух различных Ig-подобных молекул из культуры.

Как представлено в примере 10, две моноспецифических Ig-подобных молекулы можно получать в единичной клетке, где образование биспецифических Ig-подобных молекул по существу не поддается

обнаружению. Квалифицированный специалист может выбрать 3-ю молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь дикого типа или модифицированную способами инженерии содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь для предоставления указанной клетке-хозяину, так чтобы образовывалась смесь 3 моноспецифических антител и т.д.

В одном аспекте изобретения предусматривается способ по изобретению для получения по меньшей мере двух различных Ig-подобных молекул или для получения гетеродимерной Ig-подобной молекулы, где каждая из содержащих СНЗ-домен полипептидных цепей дополнительно содержит варибельную область, распознающую отличающийся эпитоп-мишень, где эпитопы-мишени расположены на одной и той же молекуле. Это часто обеспечивает более эффективное противодействие (биологической) функции указанной молекулы-мишени по сравнению с ситуацией нацеливания только на один эпитоп. Например, гетеродимерная Ig-подобная молекула может одновременно связываться с 2 эпитопами, присутствующими, например, на рецепторах факторов роста или растворимых молекулах, важных для пролиферации опухолевых клеток, тем самым эффективно блокируя несколько независимых каскадов передачи сигнала, ведущих к неконтролируемой пролиферации, и любая комбинация по меньшей мере двух Ig-подобных молекул может одновременно связываться с 2, или даже 3 или 4 эпитопами, присутствующими на таких рецепторах факторов роста или растворимых молекулах.

В предпочтительном варианте осуществления молекула-мишень представляет собой растворимую молекулу. В другом предпочтительном варианте осуществления молекула-мишень представляет собой мембраносвязанную молекулу.

В другом аспекте изобретения предусматривается способ по изобретению для получения по меньшей мере двух различных Ig-подобных молекул или для получения гетеродимерной Ig-подобной молекулы, где каждая из содержащих СНЗ-домен полипептидных цепей дополнительно содержит варибельную область, распознающую эпитоп-мишень, где эпитопы-мишени расположены на различных молекулах. В этом случае каждая из различных молекул-мишеней может представлять собой либо растворимую молекулу, либо мембраносвязанную молекулу. В одном варианте осуществления различные молекулы-мишени являются растворимыми молекулами. Альтернативно одна молекула-мишень представляет собой растворимую молекулу, в то время как вторая молекула-мишень представляет собой мембраносвязанную молекулу. В другой альтернативе обе молекулы-мишени являются мембраносвязанными молекулами. В одном варианте осуществления различные молекулы-мишени экспрессируются на одних и тех же клетках, в то время как в других вариантах осуществления различные молекулы-мишени экспрессируются на различных клетках. В качестве неограничивающего примера любая гетеродимерная Ig-подобная молекула или любая комбинация по меньшей мере двух Ig-подобных молекул может быть пригодной для одновременного блокирования множества мембраносвязанных рецепторов, нейтрализации множества растворимых молекул, таких как цитокины или факторы роста для опухолевых клеток, или нейтрализации различных серотипов вирусов или штаммов вирусов.

Один предпочтительный вариант осуществления относится к способу по изобретению для получения по меньшей мере двух различных Ig-подобных молекул или для получения гетеродимерной Ig-подобной молекулы, где по меньшей мере один из указанных эпитопов-мишеней расположен на опухолевой клетке. Альтернативно или дополнительно по меньшей мере один из указанных эпитопов-мишеней расположен на поверхности эффекторной клетки. Например, это пригодно для привлечения Т-клеток или NK-клеток для уничтожения опухолевых клеток. Например, в способе по изобретению продуцируется по меньшей мере одна Ig-подобная молекула, которая способна привлекать иммунные эффекторные клетки, предпочтительно иммунные эффекторные клетки человека, посредством специфического связывания с молекулой-мишенью, расположенной на иммунных эффекторных клетках. В следующем варианте осуществления указанная иммунная эффекторная клетка активируется при связывании Ig-подобной молекулы с молекулой-мишенью. Привлечение эффекторных механизмов может охватывать, например, перенацеливание иммуномодулируемой цитотоксичности путем введения Ig-подобной молекулы, полученной способом по изобретению, которая способна связываться с цитотоксической триггерной молекулой, такой как Т-клеточный рецептор или Fc-гамма-рецептор, тем самым активируя последующие иммунные эффекторные каскады. Термин "иммунная эффекторная клетка" или "эффекторная клетка", как используют в рамках изобретения, относится к клетке из природного репертуара клеток в иммунной системе млекопитающих, которые могут активироваться, влияя на жизнеспособность клетки-мишени. Иммунные эффекторные клетки включают клетки лимфоидного роста, такие как натуральные киллерные (NK) клетки, Т-клетки, включая цитотоксические Т-клетки или В-клетки, но также иммунными эффекторными клетками могут считаться клетки миелоидного роста, такие как моноциты или макрофаги, дендритные клетки и нейтрофильные гранулоциты. Таким образом, указанная эффекторная клетка предпочтительно представляет собой NK-клетку, Т-клетку, В-клетку, моноцит, макрофаг, дендритную клетку или нейтрофильный гранулоцит.

Антигены-мишени, присутствующие на иммунных эффекторных клетках, могут включать CD3, CD16, CD25, CD28, CD64, CD89, NKG2D и NKp46. Таким образом, дополнительно предусматривается способ в соответствии с изобретением для получения по меньшей мере двух различных Ig-подобных молекул или для получения гетеродимерной Ig-подобной молекулы, где указанный эпитоп-мишень расположен на

молекуле CD3, CD16, CD25, CD28, CD64, CD89, NKG2D или NKp46.

Жизнеспособность клетки-мишени может включать выживание, пролиферацию и/или способность клеток взаимодействовать с другими клетками.

В одном аспекте настоящее изобретение, таким образом, относится к способам по изобретению для получения гетеродимерной Ig-подобной молекулы, где каждая из содержащих СН3-домен полипептидных цепей дополнительно содержит вариабельную область, распознающую эпитоп-мишень. В одном варианте осуществления каждая из 2 вариабельных областей содержащих СН3-домен полипептидных цепей распознает один и тот же эпитоп-мишень, но с отличающейся аффинностью. В другом варианте осуществления каждая из 2 вариабельных областей содержащих СН3-домен полипептидных цепей распознает отличающийся эпитоп-мишень. В другом варианте осуществления отличающиеся эпитопы-мишени расположены на одной и той же молекуле-мишени, которая может представлять собой либо мембраносвязанную молекулу, либо растворимую молекулу. В другом варианте осуществления отличающиеся эпитопы-мишени расположены на различных молекулах-мишенях, которые могут экспрессироваться либо на одних и тех же клетках, либо на различных клетках. Альтернативно различные молекулы-мишени могут представлять собой растворимые молекулы, или одна молекула-мишень может представлять собой растворимую молекулу, в то время как вторая молекула-мишень представляет собой мембраносвязанную молекулу. В предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере одна из молекул-мишеней гетеродимерной Ig-подобной молекулы расположена на опухолевой клетке. В другом предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере одна из молекул-мишеней гетеродимерной Ig-подобной молекулы расположена на эффекторной клетке (т.е. NK-клетка, Т-клетка, В-клетка, моноцит, макрофаг, дендритная клетка или нейтрофильный гранулоцит, и указанный эпитоп-мишень может быть расположен на молекуле CD3, CD16, CD25, CD28, CD64, CD89, NKG2D или NKp46).

В предпочтительном варианте осуществления предусматривается способ по изобретению для получения по меньшей мере двух различных Ig-подобных молекул или для получения гетеродимерной Ig-подобной молекулы, где указанные по меньшей мере две различных Ig-подобных молекулы представляют собой антитела, наиболее предпочтительно антитела IgG-изотипа, еще более предпочтительно IgG1-изотипа, как описано в настоящем описании выше.

Кроме того, предусматривается Ig-подобная молекула, гетеродимерная Ig-подобная молекула, или смесь по меньшей мере двух Ig-подобных молекул, получаемая способом в соответствии с настоящим изобретением. Указанная (гетеродимерная) Ig-подобная молекула или смесь Ig-подобных молекул предпочтительно содержит по меньшей мере одну мутацию СН3, как представлено в табл. В. Также в рамках настоящего изобретения предусматривается (гетеродимерная) Ig-подобная молекула или смесь по меньшей мере двух Ig-подобных молекул, содержащая по меньшей мере одну мутацию, как представлено в табл. В, а также фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере одну Ig-подобную молекулу, или смесь по меньшей мере двух Ig-подобных молекул, в соответствии с настоящим изобретением. В одном варианте осуществления указанная Ig-подобная молекула представляет собой биспецифическую Ig-подобную молекулу, такую как биспецифическое антитело. В другом варианте осуществления указанная Ig-подобная молекула представляет собой моноспецифическую Ig-подобную молекулу, такую как моноспецифическое антитело. Один предпочтительный вариант осуществления относится к смеси по меньшей мере двух различных Ig-подобных молекул, получаемых способом по изобретению, где указанные по меньшей мере две различных Ig-подобных молекулы связываются с различными эпитопами на одном и том же антигене и/или с различными эпитопами на различных антигенах. Кроме того, предусматривается гетеродимерная Ig-подобная молекула, получаемая способом по изобретению, где указанная гетеродимерная Ig-подобная молекула связывается с различными эпитопами на одном и том же антигене и/или с различными эпитопами на различных антигенах. Преимущества и предпочтительные применения таких смесей и антител описаны в настоящем описании выше. Изобретение также относится к смеси по меньшей мере двух различных Ig-подобных молекул, получаемых способом по изобретению, где указанные по меньшей мере две различные Ig-подобные молекулы содержат по меньшей мере одну гетеродимерную Ig-подобную молекулу. В одном варианте осуществления две из указанных по меньшей мере двух различных Ig-подобных молекул представляют собой гетеродимерные Ig-подобные молекулы. Другой предпочтительный вариант осуществления относится к гетеродимерному антителу, содержащему два СН3-домена, где один из указанных двух СН3-доменов содержит аминокислотные замены L351D и L368E, и где другой из указанных двух СН3-доменов содержит аминокислотные замены T366K и L351K. Эти аминокислотные замены являются предпочтительными средствами для преимущественного образования пар между указанными двумя СН3-доменами, как объяснено выше. Аминокислотные замены L351D и L368E в одном из указанных двух СН3-доменов и аминокислотные замены T366K и L351K в другом из указанных двух СН3-доменов вместе называют "комбинацией мутаций DEKK", "вариантом DEKK", "парой DEKK", "модифицированными способами инженерии СН3-доменами DEKK", "DEKK" или используют названия, альтернативные названиям DEKK. СН3-домен, который содержит аминокислотные замены L351D и L368E, также называют "DE-стороной", и СН3-домен, который содержит аминокислотные замены T366K и L351K, также называют "KK-стороной".

Также предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая (гетеродимерную)

Ig-подобную молекулу или смесь по меньшей мере двух Ig-подобных молекул, получаемых любым способом по изобретению. Указанной (гетеродимерной) Ig-подобной молекулой или указанными по меньшей мере двумя Ig-подобными молекулами по изобретению предпочтительно является/являются антитело/антитела. Указанная фармацевтическая композиция может содержать указанную (гетеродимерную) Ig-подобную молекулу, смесь, содержащую моноспецифические или биспецифические Ig-подобные молекулы, или комбинацию моноспецифических и биспецифических Ig-подобных молекул. Кроме того, фармацевтическая композиция по изобретению содержит фармацевтически приемлемый носитель. Как используют в рамках изобретения, такой "фармацевтически приемлемый носитель" включает любые и все растворители, соли, дисперсные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие всасывание средства и т.п., которые являются физиологически совместимыми. В зависимости от пути введения (например, внутривенно, подкожно, внутрь сустава и т.п.) Ig-подобные молекулы могут быть покрыты материалом для защиты Ig-подобных молекул от действия кислот и других природных условий, которые могут инактивировать Ig-подобные молекулы. В одном аспекте предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая смесь по меньшей мере двух Ig-подобных молекул, получаемых любым способом по изобретению, где указанные по меньшей мере две различных Ig-подобных молекулы продуцированы рекомбинантными клетками-хозяевами в соответствии с настоящим изобретением. Более того, предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая гетеродимерную Ig-подобную молекулу, получаемую любым способом по изобретению, где указанная гетеродимерная Ig-подобная молекула продуцирована рекомбинантными клетками-хозяевами в соответствии с настоящим изобретением.

Также в рамках настоящего изобретения предусматривается молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая содержащую СН3-домен полипептидную цепь, которая содержит по меньшей мере одну мутацию, как представлено в табл. В, а также рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую содержащую СН3-домен полипептидную цепь, которая содержит по меньшей мере одну мутацию, как представлено в табл. В.

Далее изобретение проиллюстрировано с помощью следующих примеров. Эти примеры не ограничивают изобретение никоим образом, а могут служить для пояснения изобретения.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано (А) схематическое представление сконструированного вектора MV1057. Область вставки представляет собой область, в которую клонирована VH-область антитела. (В) Схематическое представление вектора фагового дисплея MV1043.

На фиг. 2 показана аминокислотная последовательность Fc IgG1 дикого типа, присутствующая в сконструированном векторе MV1057 (с использованием схемы нумерации EU).

На фиг. 3 показаны нуклеотидные и аминокислотные последовательности VH-областей, используемых для клонирования в различные конструкции.

На фиг. 4 показаны данные масс-спектрометрии для трансфекций А, G и H.

На фиг. 5 показаны данные масс-спектрометрии для трансфекций M и U.

На фиг. 6 показаны данные масс-спектрометрии для трансфекции O.

На фиг. 7 показано предотвращение гомодимеризации посредством замены нейтральных аминокислот заряженными аминокислотами.

На фиг. 8 показан нативный спектр MS для образца трансфекции ZO (T366K/L351'D) (А) и свернутый спектр MS для образца трансфекции ZO (T366K/L351'D). Второй/главный пик соответствует биспецифической молекуле (В).

На фиг. 9 даны показатели HADDOCK для экспериментально подтвержденных пар мутаций.

На фиг. 10 показано динамическое изображение взаимодействий на поверхности контакта СН3-СН3; (А) K409D:K392D/D399'K:E356'K; (В) D399K:E356K/D399'K:E356'K; (С) K409D:K392D/K409'D:K392'D.

На фиг. 11 даны показатели HADDOCK для различных зарядовых мутантов 366/351'.

На фиг. 12 показаны динамические изображения на границе контакта СН3-СН3; (А) L351D/L351'D; (В) L351D:S354A:R355D/L351'D:S354'A:R355'D.

На фиг. 13 даны показатели HADDOCK для дополнительных зарядовых мутаций рядом с положением L351.

На фиг. 14 даны показатели HADDOCK для дополнительных зарядовых мутаций рядом с положением E366K в цепи А и с положением L351 в цепи В.

На фиг. 15 показаны динамические изображения для взаимодействий на поверхности контакта СН3-СН3.

На фиг. 16 даны показатели HADDOCK для вариантов рядом с T366/L351.

На фиг. 17 даны показатели HADDOCK для дополнительных вариантов рядом с T366/L351.

На фиг. 18 показаны примеры спектров nMS для биспецифического IgG, полученного после совместной экспрессии конструкции T366K,L351K с конструкцией либо L351D (левая панель), либо L351D,Y349E (правая панель), с увеличенным изображением состояния одиночного заряда полного IgG (половинные молекулы не представлены).

На фиг. 19 показаны (А) результаты нативной MS, демонстрирующие относительный избыток AA,

AB, BB, A и B (общее количество всех типов составляет 100%); (B) то же самое, но без AB, чтобы иметь лучший обзор нежелательных типов AA, BB, A и B.

На фиг. 20 показаны результаты анализа термостабильности. Квадраты: дикий тип; треугольники: пара с обращенным зарядом E356K:D399K/K392D:K409D; круги: комбинации мутантов CH3, как указано выше каждого графика.

На фиг. 21 показаны результаты для эксперимента по 10× замораживанию-размораживанию. 1122=1-й родительское антитело BB; 1337=2-е родительское антитело AA; дикий тип=AA, AB, BB; CR=биспецифическая молекула с парой обращенных зарядов E356K:D399K/K392D:K409D; 3-6 и 9-12=биспецифические молекулы из комбинаций 3-6 и 9-12 из табл. 15.

На фиг. 22 показаны результаты стабильности в сыворотке, измеренные с помощью ELISA с использованием фибриногена в качестве нанесенного антигена. (A) Данные ELISA для образцов IgG, разбавленных до 0,5 мкг/мл. (B) Данные ELISA для образцов IgG, разбавленных до 0,05 мкг/мл. Результаты нормализованы к моменту времени T=0 суток (100%). 1337=2-е родительское антитело AA; дикий тип=AA, AB, BB; CR=биспецифическая молекула с парой обращенных зарядов E356K:D399K/K392D:K409D; 3-6 и 9-12 биспецифические молекулы из комбинаций 3-6 и 9-12 из табл. 15.

На фиг. 23 показаны результаты pMS в экспериментах по изменению соотношения с соотношениями при трансфекции от 1:5 до 5:1. (A) Комбинация мутаций DEKK со специфичностью "A" на DE-стороне и "B" на KK-стороне; (B) комбинация мутаций DEKK со специфичностью "C" на DE-стороне и "B" на KK-стороне; (C) комбинация мутаций с обращением заряда со специфичностью "A" на стороне E356K:D399K и "B" на стороне K392D:K409D.

На фиг. 24 показаны результаты pMS для трансфекций #1-11 из табл. 20.

На фиг. 25 даны показатели HADDOCK для димеров с различными сконструированными векторами для CH3. Серые столбцы: желаемые типы AB и CD; черные столбцы: нежелательные типы AA, BB, CC, DD, AC, BC, AD, BD.

На фиг. 26 показаны SDS-PAGE для трансфекций #1-11 из табл. 20. Также включены контрольные образцы DE/KK, DE/DE и KK/KK.

На фиг. 27 показаны pMS для трансфекций #9 (A) и #11 (B).

На фиг. 28 показаны pMS для образцов после гель-фильтрации 1516:1516 (A), 1337:1337 (B) и 1516:1337 (C).

На фиг. 29 показаны сывороточные уровни образцов сконструированного антитела DEKK и двух его родительских антител (исследование pK).

Примеры

Пример 1. Аминокислотные замены для создания различных CH3-доменов.

Чтобы иметь широкое множество Ig-подобных молекул, которые отличаются их CH3-доменами, так что образование пар между содержащими CH3-домен Ig-подобными молекулами предпочтительно усиливается или ингибируется, ряд аминокислотных замен, о которых было известно, что они усиливают образование гетеродимера, а также ряд альтернативных аминокислотных замен, которые ранее не были ни описаны, ни исследованы, но которые были выбраны для усиления образования гомодимера, вносили в сконструированный вектор (сконструированный вектор MV1057; фиг. 1A). Сконструированный вектор MV1057 содержит последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие нормальную Fc-часть IgG1 дикого типа, как представлено на фиг. 2. В табл. 1 приведены аминокислотные замены, которые вносили в эту Fc дикого типа с получением серии из семи конструкций. Все конструкции получали в Geneart. Ранее было описано, что конструкции 1, 2 и 3, или их альтернативы запускают гетеродимеризацию (EP 01870459; WO 2009/089004), как и конструкции 6 и 7 (WO 98/50431). Конструкции 4 и 5 являются новыми и сконструированы для усиления гомодимеризации.

Таблица 1

Замены AA в CH3	# конструкции	Образует пару с	описанный % биспецифического продукта
- (дикий тип)	-	- (дикий тип)	~50%
E356K, D399K	1	Конструкция 2 или 3	~100%

K392D, K409D	2	Конструкция 1	~100%
K392D, K409D, K439D	3	Конструкция 1	~100%
K392D, D399K, K409D	4	Конструкция 4	
E356K, E357K, K439D, K370D	5	Конструкция 5	
T366W	6	Конструкция 7	~86,7%
T366S, L368A, Y407V	7	Конструкция 6	~86,7%

Пример 2. Клонирование VH в конструкции с мутациями СНЗ.

Несколько VH-областей антитела с известной специфичностью и известной способностью образовывать пары с легкой цепью IGKV1-39 человека использовали для клонирования в эти конструкции.

Как указано ранее, все варианты СНЗ можно использовать вместе с другими доменами антител с получением полноразмерных антител, которые являются либо биспецифическими, либо моноспецифическими. Специфичность антитела, определяемая комбинациями VH/VL, не влияет на поведение димеризации тяжелых цепей, которое запускается СНЗ-доменами. На протяжении исследований использовали модельные комбинации VH/VL, где все VL основаны на IGKV1-39 человека эмбрионального типа и VH варьируют. На фиг. 3 представлены полноразмерные последовательности и специфичности VH-областей антител, используемых на протяжении исследований. Кодирование MF относится к внутреннему обозначению Megus для различных VH, например VH MF1337 обладает специфичностью к столбнячному токсину, MF1025 обладает специфичностью к тиреоглобулину свиней, MF1122 обладает специфичностью к фибриногену крупного рогатого скота.

Области VH, присутствующие в векторе фагового дисплея MV1043 (фиг. 1B), расщепляют ферментами рестрикции SfiI и BstEII (New England Biolabs/ каталожный номер #R0123L и R0162L/ в соответствии с инструкциями изготовителя), которые высвобождают фрагмент VH из этого вектора. Вектор MV1057 расщепляют SfiI и BstEII по стандартным методикам (в соответствии с инструкциями изготовителя). Фрагменты и вектор очищают в геле (Promega/ каталожный номер #V3125/ в соответствии с инструкциями изготовителя) для выделения разрезанного вектора и вставок гена VH. Оба из них объединяют путем лигирования, после чего продукт лигирования трансформируют в DH5 α E.coli (Invitrogen/ каталожный номер #12297-016/ в соответствии с инструкциями изготовителя). После селекции в течение ночи единичные колонии отбирают и векторы с правильной вставкой идентифицируют посредством секвенирования.

Пример 3. Трансфекция и экспрессия полного IgG в клетках HEK293T.

Трансфекцию различных плазмид, кодирующих повторно клонированные варианты VH, и дополнительно кодирующих общую легкую цепь huIGKV1-39, в клетки HEK293T проводили по стандартным методикам так, чтобы IgG мог экспрессироваться (de Kruif et al., Biotech. Bioeng., 2010). После трансфекции уровни экспрессии IgG в супернатантах измеряли с использованием системы ForteBIO Octet-QK, которая основана на Bio-Layer Interferometry (BLI) и которая обеспечивает количественное определение в реальном времени и охарактеризацию кинетики биомолекулярных взаимодействий; для деталей см. www.fortebio.com. Когда определяли уровни экспрессии, превышающие 5 мкг/мл, IgG очищали с использованием аффинной очистки с белком А.

Пример 4. Очистка IgG.

Культуральные супернатанты очищали с использованием колонок с белком А (GE Healthcare/каталожный номер #11-0034-95/ в соответствии с инструкциями изготовителя) и элюировали в 0,1 М цитратном буфере, pH 3,0, и сразу нейтрализовывали в равном объеме 1,0 М Tris-HCl pH 8,0 или прямо заменяли буфер на PBS с использованием колонки для обессоливания. Альтернативно можно очищать IgG с использованием гранул с белком А (гранулы сефарозы CL-4B, GE healthcare, каталожный номер #170780-01).

Пример 5. Ag-специфические ELISA.

Антиген-специфические ELISA проводили для установления активности связывания против антигенов и улавливающий ELISA проводили, чтобы продемонстрировать активность связывания биспецифических антител. Для обнаружения комплекса использовали биотинилированный второй антиген (de Kruif et al., Biotech. Bioeng., 2010).

Пример 6. SDS-PAGE.

Очищенные смеси IgG анализировали с помощью SDS-PAGE (NuPAGE® 4-12% бис-трис гель/Invitrogen/каталожный номер #NP0323BOX) в восстанавливающих и невосстанавливающих услови-

ях по стандартной методике, и окрашивание белков в геле проводили с помощью коллоидного синего (раствор для окрашивания белков PageBlue™/Fermentas/каталожный номер #RO571).

Пример 7. Ферментативное дегликозилирование IgG1.

Поскольку существует гетерогенность гликозилирования IgG, белки дегликозилировали для получения единого продукта с отличающейся массой, пригодного для масс-спектроскопического анализа. Одну единицу N-гликозидазы F (PNG-аза F; Roche Diagnostics, Mannheim, Германия) инкубировали на 10 мкг IgG1, в течение ночи при 37°C. Замену буфера с использованием центрифужных фильтрующих колонок 10 кДа MWCO (Millipore) проводили для удаления исходного буфера для очистки (0,1 М цитратный буфер, pH 3,0/1,0 М Tris-HCl, pH 8,0) и для замены буфера на PBS. Сходные процессы замены буфера проводили для удаления отщепленных гликановых цепей и для замены буфера на 150 мМ ацетат аммония, pH 7,5. Фильтры промывали с помощью 200 мкл 150 мМ ацетата аммония, pH 7,5, в течение 12 мин при 11000 об/мин и при 4°C. После промывания 50 мкл дегликозилированного IgG наносили на фильтр и добавляли 450 мкл 150 мМ ацетата аммония, pH 7,5, а затем проводили другой раунд центрифугирования в течение 12 мин при 11000 об/мин при 4°C. В целом центрифугирование повторяли 5 раз, каждый раз свежий 150 мМ аммоний-ацетатный буфер, pH 7,5, добавляли до общего объема 500 мкл. После последней стадии центрифугирования оставшийся буфер заменяли дегликозилированным IgG1, приблизительно 25 мкл собирали и переносили в пробирку erpendorf, готовую для масс-спектроскопического анализа.

Пример 8. Нативный масс-спектроскопический анализ.

Масс-спектрометрию использовали для идентификации различных типов IgG в очищенных смесях IgG и для установления соотношений, в которых эти типы IgG присутствовали. В кратком изложении 2-3 мкл IgG в концентрации 1 мкМ в 150 мМ ацетате аммония, pH 7,5, помещали в позолоченные боросиликатные капилляры, изготовленные в собственной лаборатории (с использованием устройства для вытягивания Sutter P-97 [Sutter Instruments Co., Novato, CA, США] и шестиструйного устройства для нанесения покрытий Edwards Scancoat [Edwards Laboratories, Milpitas, CA, США]) для анализа на масс-спектрометре LCT 1 (Waters Corp., Milford, MA, США), настроенном для оптимального проведения детекции высоких масс (Tahallah et al., RCM, 2001). Использовали напряжение на капиллярах 1300 В и напряжение на конусе для взятия образцов 200 В; однако эти параметры корректировали, когда требовалось более высокое разрешение соотношения "сигнал к шум". Давление накачки из источника повышали до приблизительно 7,5 мбар для ускорения уменьшения энергии за счет столкновений. Для определения IgG1 в денатурирующих условиях белки распыляли в концентрации 1 мкМ в 5% муравьиной кислоте.

Пример 9. Обработка и количественное определение данных.

Обработку полученных спектров проводили с использованием программного обеспечения MassLynx 4.1 (Waters Corp., Milford, MA, США). Использовали минимальное сглаживание, после чего спектры центрировали. Массу типов молекул вычисляли с использованием каждого зарядового состояния последовательно. Соответствующие интенсивности каждого зарядового состояния присваивались с помощью MassLynx и суммировались. Этот подход позволил относительное количественное определение всех типов молекул в образце. Альтернативно количественное определение пиков можно проводить с использованием методов площади под кривой (AUC), известных в данной области. Все анализы повторяли три раза для вычисления стандартных отклонений как масс IgG, а также их относительного содержания.

Пример 10. Смеси 2 или 3 моноспецифических антител из единичной клетки.

Несколько VH-областей антител с известной специфичностью и известной способностью образовывать пары с легкой цепью IGKV1-39 человека (фиг. 3) использовали для повторного клонирования в сконструированный вектор дикого типа MV1057, или в конструкцию 4 или конструкцию 5 табл. 1, с получением векторов I-III (табл. 2). Затем полученные векторы I, II и III, каждый из которых содержал последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие общую легкую цепь человека, а также тяжелую цепь Ig с отличающейся областью CH3 и отличающейся специфичностью VH, трансфицировали в клетки, либо отдельно, чтобы продемонстрировать образование только интактных моноспецифических антител, либо в комбинации с одним или двумя другими сконструированными векторами с получением смесей двух моноспецифических или трех моноспецифических антител. В табл. 3 представлена схема и результаты трансфекции.

Таблица 2

Специфичность VH, встроенных в различные конструкции

Вектор	Ген VH	Антигенная специфичность	Масса VH (Да)	Обозначение Merus	клонирован в конст-рукцию #
I	IGHV 1.08	Столбняк (А)	13703	MF1337	дикий тип
II	IGHV 3.23	Тиреоглобулин (В)	12472	MF1025	4
III	IGHV 3.30	Фибриноген (С)	12794	MF1122	5

Таблица 3

Схема и результаты трансфекции

# полученных отличающихся моноспецифических молекул	Объект транс-фекции	Код транс-фекции и соотношение	Ожида-емый тип	Вычис-ленная масса -2LYS	Экспери-менталь-ная масса	Выявлен-ные AA (%)	Выявлен-ные ВВ (%)	Выявлен-ные СС (%)	Другие молекулы (%)
1	Только вектор I	A	AA	146521	146503	100			
1	Только вектор II	G	ВВ	144032	144087		100		
1	Только вектор III	H	СС	144647	144656			100	
2	Вектор I и II	M (I:II=1:1)	AA ВВ	146521 144032	146518 144030	51	45		4
2	Вектор I и III	N (I:III=1:1)	AA СС	146521 144647	146509 144633	88		9	3
		U (I:III=1:5)	AA СС	146521 144647	146522 144643	47		48	5
2	Вектор II и III	nd	ВВ СС						
3	Вектор I, II и III	O (I:II:II I=1:1:1)	AA ВВ СС	146521 144032 144647	146525 144032 144650	66	4	30	
		V (I:II:II I=1:1:10)	AA ВВ СС	146521 144032 144647	146531 144043 144654	8	81	9	2

nd=не проводили.

Было выявлено, что трансфекции А, G и H приводили к образованию только гомодимеров, и 100% двухвалентных моноспецифических AA, ВВ или СС было извлечено из клеток, трансфицированных любым из векторов I, II или III (фиг. 4). Хотя это ожидалось и ранее было продемонстрировано для трансфекции А, в настоящее время в действительности впервые показана гомодимеризация тяжелых цепей Ig с модифицированными способами инженерии СНЗ, содержащими либо тройную аминокислотную замену из конструкции 4 (т.е. K392D, D399K, K409D), либо четырехкратную аминокислотную замену из конструкции 5 (т.е. E356K, E357K, K439D, K370D) (трансфекции G и H).

Далее проводили эксперименты по коэкспрессии двух векторов в одной клетке. Интересно, что трансфекции M и N демонстрируют, что тяжелые цепи Ig дикого типа и тяжелые цепи Ig с модифицированными способами инженерии СНЗ могут коэкспрессироваться в единичной клетке вместе с общей лег-

кой цепью, что приводит к смеси двух типов моноспецифических антител без присутствия нежелательных биспецифических антител и только с 4-5% примесей "других молекул", присутствующих в смеси. "Другие молекулы" определяют как все молекулы, которые не имеют массы интактного IgG, и включают половинные молекулы, состоящие из одной пары тяжелой и легкой цепей. Важно, что фракция "других молекул" не включает биспецифический продукт. При трансфекции М соотношение АА:ВВ было близким к 1:1, если трансфицировали равные соотношения векторной ДНК. Однако трансфекция N привела к соотношению АА:СС практически 10:1. Таким образом, эту трансфекцию повторяют с измененными соотношениями ДНК (трансфекция U). Действительно, соотношение 1:5 векторной ДНК I:III уравновешивало соотношение антительного продукта АА:СС в смеси практически до соотношения 1:1. Таким образом, трансфекции М и U демонстрируют, что возможно экспрессировать два по существу чистых моноспецифических антитела в единичной клетке без нежелательных побочных продуктов (т.е. без избыточного присутствия АС или половинных молекул А или С) (фиг. 5). Новые модификации СНЗ конструкций 4 и 5 существенно отличаются от СНЗ дикого типа, так что гетеродимеризация между диким типом и 4, или диким типом и 5, не происходит, что является преимущественным для применения при крупномасштабной продукции смесей моноспецифических антител из единичных клеток.

Аналогично этим результатам, также ожидается, что трансфекция двух различных тяжелых цепей Ig с модифицированными способами инженерии СНЗ (конструкции 4 и 5) приведет к смесям только двух различных моноспецифических антител без присутствия других нежелательных типов молекул. Был сделан вывод, что модификации СНЗ конструкции 4 существенно отличаются от модификаций СНЗ конструкций 5, так что гетеродимеризация не происходит. В этом случае коэкспрессия тяжелых цепей с модифицированным СНЗ конструкций 4 и 5 вместе с тяжелыми цепями с СНЗ дикого типа в единичной клетке приведет только к 3 моноспецифическим антителам.

Действительно, это было подтверждено, поскольку было выявлено, что также смесь трех чистых моноспецифических антител может быть получена путем экспрессии трех различных тяжелых цепей Ig, сконструированных так, чтобы они образовывали гомодимеры, а не гетеродимеры, вместе с общей легкой цепью в единой клетке без присутствия в смеси примесей (трансфекция O) (фиг. 6). Как очевидно из табл. 3, при равных соотношениях векторных ДНК, использованных во время трансфекции O, не было получено соотношения 1:1:1 для антител АА:ВВ:СС. Трансфекция с измененными соотношениями векторной ДНК (1:1:10, трансфекция V) продемонстрировала, что соотношения АА:ВВ:СС в смесях можно скорректировать в направлении желательных соотношений.

Взяты вместе, эти эксперименты демонстрируют, что два или три по существу чистых моноспецифических антитела могут экспрессироваться в единичной клетке без нежелательных побочных продуктов, что обеспечивает преимущество для крупномасштабной продукции смесей терапевтических моноспецифических антител.

Пример 11. Смеси 2 биспецифических антител из единичной клетки.

В то время как применение тяжелых цепей с модифицированными способами инженерии СНЗ для продукции единичных биспецифических антител было описано в других источниках, этот эксперимент был задуман для исследования, является ли осуществимым продуцирование смесей 2 различных биспецифических антител из единичной клетки.

VH-области антител с известной специфичностью и известной способностью образовывать пару с легкой цепью IGKV1-39 человека (фиг. 3) использовали для повторного клонирования в векторы, содержащие конструкции 1-3 или 6-7, представленные в табл. 1, с получением векторов IV-X (табл. 4). Затем векторы IV-X, каждый из которых содержал последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие общую легкую цепь человека, а также тяжелую цепь Ig с отличающейся областью СНЗ и отличающейся специфичностью VH, трансфицировали в клетки либо отдельно, чтобы продемонстрировать препятствование образованию интактных моноспецифических антител, либо в комбинации с другим сконструированным вектором, для получения биспецифических антител или смесей двух биспецифических антител. В табл. 5 представлена схема и результаты трансфекции.

Таблица 4

Специфичность VH, встроенных в различные конструкции

Вектор	ген VH	Антигенная специфичность	Масса VH (Да)	Клонирован в конструкцию #
IV	IGHV 3.23	Тиреоглобулин (B)	12472	1
V	IGHV 3.30	Фибриноген (C)	12794	2
VI	IGHV 1.08	Столбняк (A)	13703	2
VII	IGHV 3.30	Фибриноген (C)	12794	3
VIII	IGHV 1.08	Столбняк (A)	13703	3
IX	IGHV 1.08	Столбняк (A)	13703	6
X	IGHV 3.23	Тиреоглобулин (B)	12472	7

Таблица 5

# продуцированной отличающейся биспецифической молекулы	Объект трансфекции	Код трансфекции и соотношение	Ожидаемые типы	Вычисленная масса -2LYS	Экспериментальная масса	Выявленные половинные молекулы (%)	Выявленный полный IgG (%)	Выявленные биспецифические молекулы (%)	Другие молекулы (%)
0	вектор IV	B	половинный B	144082	144066	40	60		
0	вектор V	C	половинный C	144651	144622	77	23		
0	вектор VI	D	половинный A	146469	146459	23	77		
0	вектор VII	E	половинный C	144625	144643	76	24		
0	вектор VIII	F	половинный A	146443	146468	64	36		
0	вектор IX	P	половинный A	146691	146677	82	18		
0	вектор X	Q	половинный B	143818	143844	58	42		
1	Вектор IV и V	I (1:1)	BC	144367	144352			96	4
1	Вектор IV и VII	J (1:1)	BC	144354	144382			96	4
2	Вектор IV, V и VI	K(1:1:1)	BC+AB	144367+ 145276	144351+ 145260			38+47	15 (A+C)
		S(2:1:1)	BC+AB	144367+ 145276	144371 + 145277			42+55	3 (BB)
2	Вектор IV, VII и VIII	L (1:1:1)	BC+AB	144354+ 145263	144346 + 145255			16+60	24 (A+C)
		T (2:1:1)	BC+AB	144354+ 145263	144385+1 45292			58+39	3 (BB)

Ранее было продемонстрировано, что тяжелые цепи Ig с модифицированными способами инженерии СНЗ, кодируемые конструкциями 1 и 2, тем не менее способны образовывать гомодимеры при экспрессии отдельно в единичных клетках (WO 2009/089004). Однако в WO 2009/089004 далее описано, что СНЗ-домены, которые сконструированы так, чтобы они содержали мутации трех зарядовых пар, такие как присутствуют в конструкции 3, более не способны образовывать гомодимеры при экспрессии отдельно.

В настоящем исследовании эти данные были только частично подтверждены. Действительно, результаты трансфекций В, С и D продемонстрировали присутствие полных IgG, в дополнение к высокой доле неспаренных половинных молекул, демонстрируя некоторую гомодимеризацию СНЗ-доменов, кодируемых конструкциями 1 и 2. Трансфекции Е и F также приводили к продукции полных IgG в дополнение к непарным половинным молекулам, что демонстрирует, что тройные зарядовые мутации конструкции 3 не полностью нарушают гомодимеризацию.

Более того, также было продемонстрировано, что варианты СНЗ с "выступом" и "полостью" конструкций 6 и 7 образуют гомодимеры (18% гомодимеров "выступ-выступ" и 42% гомодимеров "полость-полость").

Варианты СНЗ, которые полностью препятствуют гомодимеризации при экспрессии отдельно, являются предпочтительными, чтобы предотвратить или минимизировать нежелательные побочные продукты (гомодимеры) при коэкспрессии со вторым вариантом СНЗ для гетеродимеризации.

Интересно, что данные эксперименты впервые демонстрируют, что также смеси биспецифических антител могут экспрессироваться в единичных клетках практически без гомодимеров в смеси. Трансфекции К и L отчетливо демонстрируют, что действительно получают ожидаемые биспецифические типы ВС+АВ (38+47% при трансфекции К, и 16+60% при трансфекции L). При обеих трансфекциях наблюдали относительно высокий процент нежелательных половинных молекул (15% половинной молекулы А+половинной молекулы С при трансфекции К, и 24% половинной молекулы А+половинной молекулы С при трансфекции L). Относительно высокий процент присутствующих половинных молекул был объяснен низкими количествами совпадающих тяжелых цепей вектора IV вследствие несбалансированной экспрессии тяжелых цепей в соответствующей паре. Таким образом, трансфекции повторяли при скорректированном соотношении векторных ДНК, 2:1:1, в трансфекциях S и T. Это приводило к равным количествам тяжелых цепей IgG, составляющих соответствующую пару, и чистым смесям биспецифических IgG без присутствия половинных молекул IgG и с присутствием только 3% гомодимерного ВВ. В идеальном случае, эта низкая доля примесей моноспецифического продукта должна быть снижена по существу до нуля. Таким образом, является желательным найти дополнительные мутанты СНЗ, которые привели бы к смесям биспецифических антител с минимальным присутствием примесей моноспецифических антител.

В настоящем исследовании впервые продемонстрировано, что по существу чистые смеси двух биспецифических антител, распознающие 3 различных эпитопа-мишени, можно продуцировать в единичной клетке с минимальным присутствием моноспецифических антител в смеси.

Пример 12. Разновидности смесей.

Поскольку было продемонстрировано, что продукция смесей 2 биспецифических антител, распознающих 3 эпитопа, из единичной клетки или продукция смесей 2 или 3 моноспецифических антител из единичной клетки является технически осуществимой, авторы настоящего изобретения далее исследовали возможность контролируемой продукции различных других смесей. Четвертую VH-область антитела с известной специфичностью и известной способностью образовывать пару с легкой цепью человека IGKV1-39 используют для повторного клонирования в векторы, содержащие конструкции 1-3 или 7 табл. 1, с получением векторов I', II', III' или X' (X' указывает на отличающуюся специфичность по сравнению с соответствующими номерами векторов). Затем полученные векторы I'-III', X' и IV-IX, каждый из которых содержит последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие общую легкую цепь человека, а также тяжелую цепь Ig с отличающейся областью СНЗ и отличающейся специфичностью VH, трансфицируют в клетки в комбинации с другими сконструированными векторами с получением различных смесей биспецифических и/или моноспецифических антител. Множество смесей, которые получают, включают смеси 2 биспецифических антител, распознающих 4 эпитопа, 2 биспецифических антител и одного моноспецифического антитела, или смеси 1 биспецифического и одного моноспецифического антитела из единичной клетки. В табл. 6 представлена схема трансфекции и ожидаемые результаты.

Таблица 6

Разновидность смеси	Объект трансфекции	Код трансфекции и соотношение	Ожидаемый тип	Ожидаемый % моноспецифического IgG	Ожидаемый % биспецифической молекулы
2 BsAb, 4 эпитопа	IV+V+IX+X'	ZA (1:1:1:1)	BC+AD	0	50+50
2 BsAb, 4 эпитопа	IV+VII+IX+X'	ZB (1:1:1:1)	BC+AD	0	50+50
2 bsAb+1 mAb	IV+V+VI+wt'	ZC (2:1:1:2)	BC+AB+DD	33	33+33
2 bsAb+1 mAb	IV+V+VI+II'	ZD (2:1:1:2)	BC+AB+DD	33	33+33
2 bsAb+1 mAb	IV+V+VI+III'	ZE (2:1:1:2)	BC+AB+DD	33	33+33
1 bsAb+1 mAb	IV+V+wt'	ZF (1:1:2)	BC+DD	50	50
1 bsAb+1 mAb	IV+V+II'	ZG (1:1:2)	BC+DD	50	50
1 bsAb+1 mAb	IV+V+III'	ZH (1:1:2)	BC+DD	50	50
1 bsAb+1 mAb	IV+VII+wt'	ZI (1:1:2)	BC+DD	50	50
1 bsAb+1 mAb	IV+VII+II'	ZJ (1:1:2)	BC+DD	50	50
1 bsAb+1 mAb	IV+VII+III'	ZK (1:1:2)	BC+DD	50	50
1 bsAb+1 mAb	IX+X+wt'	ZL (1:1:2)	AB+DD	50	50
1 bsAb+1 mAb	IX+X+II'	ZM (1:1:2)	AB+DD	50	50
1 bsAb+1 mAb	IX+X+III'	ZN (1:1:2)	AB+DD	50	50

Хотя теоретические получение всех смесей должно быть осуществимым, из предшествующей работы других авторов известно, что крупномасштабной продукции классических вариантов "выступ-в-полости" препятствуют проблемы нестабильности. Таким образом, ожидается, что получение смесей в результате трансфекций ZA, ZB, ZL, ZM и ZN станет проблематичным при переходе на крупномасштабную продукцию.

Таким образом, текущий набор конструкций, присутствующих в табл. 1, не позволяет получение всех теоретических смесей из единичных клеток в более крупном масштабе, поскольку описано, что варианты "выступ-в-полости" являются нестабильными, и нельзя исключить, что СНЗ-домены, содержащие "выступ" или "полость", будут димеризоваться либо с зарядовыми вариантами, либо с СНЗ-доменами дикого типа. Таким образом, является желательным моделирование новых вариантов СНЗ, которые сконструированы так, чтобы предпочтительно образовывать только гомодимеры или гетеродимеры, и которые не гомодимеризуются или не гетеродимеризуются с конструкциями 1-5 табл. 1, чтобы обеспечить возможность коэкспрессии в единичных клетках.

Пример 13. Идентификация новых мутантов зарядовых пар.

Задачей данного исследования было конструирование СНЗ-области IgG так, чтобы обеспечить продукцию только гетеродимеров или только гомодимеров при смешанной экспрессии различных тяжелых цепей IgG в единичной клетке, где новые сконструированные СНЗ-домены не гомодимеризуются или не гетеродимеризуются с известными сконструированными СНЗ-доменами, или с СНЗ-доменами дикого типа. Таким образом, в качестве первой стадии при идентификации новых сконструированных СНЗ-доменов, которые удовлетворяют критериям, многие остатки поверхности контакта в СНЗ-доме IgG сканировали по одному или группами в отношении замен, которые приведет к отталкиванию идентичных тяжелых цепей, т.е. снижению образованию гомодимеров, посредством электростатических взаимодействий. Задачей было получение перечня остатков, которые, когда они замещены заряженным остатком, приведут к отталкиванию идентичных цепей, так что эти мутации можно использовать для обеспечения образования гомодимеров и/или гетеродимеров при смешанной экспрессии различных тяжелых цепей IgG, при этом полученные полноразмерные IgG являются стабильными и продуцируются при высоких долях. По итогам, идентифицированные замены используют для получения биспецифических антител или смесей биспецифических или моноспецифических антител путем модификации способами инженерии соответствующих пар остатков СНЗ в одной или нескольких тяжелых цепях IgG - областях СНЗ. Кроме того, вновь идентифицированные пары мутаций заряда можно комбинировать с существующими парами, так чтобы несколько молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих различные тяжелые цепи, все из которых содержат различные и взаимодополняющие мутации СНЗ, можно было использовать для экспрессии в таких клетках, чтобы предпочтительно можно было получить смеси только моноспецифических антител, или только биспецифических антител, или смеси определенных моноспецифических и биспецифических антител. Остатки, подлежащие изучению в настоящем исследовании, представляют собой контактные остатки, как указано ранее (Deisenhofer J., 1981; Miller S., 1990; Padlan, 1996, Gunasekaran, 2010). Обоснованием этого подхода является то, что отталкивающие заряды встраивают способами инженерии в каждую доступную пару контактирующих остатков. Затем образцы анализируют

на невосстанавливаемом SDS-PAGE для идентификации пар, в которых снижено образование димера, что визуализируют по присутствию полос размером приблизительно 72 кДа. Все доступные пары подвергают скринингу в качестве единичных мутаций или в комбинации с единичной другой мутацией, поскольку отталкивающего электростатического взаимодействия между одной несоответствующей парой может быть достаточно или может быть недостаточно, чтобы образовалось достаточное количество половинных молекул для обнаружения этим способом, также мутации комбинируют.

Аминокислотные замены вносили в сконструированный вектор MV1057 в Geneart в соответствии с табл. 7 и экспрессию конструкций проводили посредством трансфекции в клетки HEK293T по стандартным методикам. Уровни экспрессии IgG измеряли в Octet. Когда продукция дважды оказывалась неудачной, мутацию считали неблагоприятной для экспрессии и мутацию далее не исследовали.

Таблица 7

Перечень аминокислотных замен в различных
конструкциях, которые были внесены (нумерация EU)

Замены AA в CH3	# конструкции	Эффект на образование гомодимера (- = нет эффекта; +++ = максимальное ингибирование; NT= не исследовали на геле)
Q347K	8	-
Y349D	9	+-
Y349K	10	+-
T350K	11	-
T350K, S354K	12	+-
L351K, S354K	13	+-
L351K, T366K	14	++
L351K, P352K	15	+-
L351K, P353K	16	++
S354K, Y349K	17	++
D356K	18	-
E357K	19	-
S364K	20	++
T366K, L351K	21	++
T366K, Y407K	22	+++
L368K	23	NT
L368K, S364K	24	++
N390K, S400K	25	+-
T394K, V397K	26	+
T394K, F405K	27	+++
T394K, Y407K	28	+++
P395K, V397K	29	+-

S400K	30	-
F405K	31	+++
Y407K	32	++
Q347K, V397K, T394K	33	+
Y349D, P395K, V397K	34	+
T350K, T394K, V397K	35	NT
L351K, S354K, S400K	36	+
S354K, Y349K, Y407K	37	+ -
T350K, N390K, S400K	38	+ -
L368K, F405K	39	++
D356K, T366K, L351K	40	+++
Q347K, S364K	41	+++
L368D, Y407F	42	+
T366K	43	+
L351K, S354K, T366K	44	+
Y349D, Y407D	45	+
Y349D, S364K, Y407D	46	+
Y349D, S364K, S400K, T407D	47	+
D399K	48	+ -
D399R	49	+ -
D399H	50	+ -
K392D	51	+ -
K392E	52	+ -
K409D	53	+

Супернатанты, содержавшие ≥ 5 мкг/мл IgG, анализировали в SDS-PAGE, и IgG очищали с использованием белка А. Белки окрашивали с использованием коллоидного синего. Гомодимеры были видны в качестве полосы размером приблизительно 150 кДа. Полосы меньших размеров, составляющие приблизительно 75 кДа, отражали присутствие половинных молекул (см. отрицательный контроль: K392D, K409D). Блоты представлены на фиг. 7.

Результаты гелей SDS-PAGE анализировали и оценивали, как показано в табл. 7, правая колонка. Ряд остатков считали перспективными для дальнейшего исследования в комбинации, включая остатки Q347, S354, Y349, L351, K360, T366, T394 и V397. Выбор был основан на высоких показателях ингибирования образования гомодимеров в сочетании с доступностью контактирующих остатков, которые могут быть модифицированы, не сталкиваясь с проблемами, такими как другие некомплементарные заряды. Например, известно, что остатки F405 и Y407 имеют множество взаимодействий на поверхности контакта CH3-CH3, включая взаимодействия с остатками, которые уже заряжены, что может быть проблематичным после внесения множества зарядовых мутаций в эти взаимодействующие остатки (см. табл. А). Новые конструкции встраивали в вектор MV1057 (табл. 8) и VH-области антитела с известной специфичностью и известной способностью образовывать пару с легкой цепью IGKV1-39 человека использовали для повторного клонирования в векторы, содержащие эти новые конструкции (см. табл. 9), так что комбинации можно было исследовать далее. В табл. 10 представлены схемы и результаты трансфекции.

Таблица 8

Замены AA с CH3	# конструкции
L351K	61
T394K	62
L351D	63
T366D	64
S354D, Y349D	65
V397D	66
K360D	67

Таблица 9

Специфичность VH, встроенных в различные конструкции

Вектор	ген VH	Антигенная специфичность	Масса VH (Да)	Клонирован в конструкцию #
XI	IGHV 1.08	Столбняк (А)	13703	8
XII	IGHV 1.08	Столбняк (А)	13703	17
XIII	IGHV 1.08	Столбняк (А)	13703	43
XIV	IGHV 1.08	Столбняк (А)	13703	61
XV	IGHV 1.08	Столбняк (А)	13703	62
XVI	IGHV 3.30	Фибриноген (С)	12794	63
XVII	IGHV 3.30	Фибриноген (С)	12794	64
XVIII	IGHV 3.30	Фибриноген (С)	12794	65
XIX	IGHV 3.30	Фибриноген (С)	12794	66
XX	IGHV 3.30	Фибриноген (С)	12794	67

Таблица 10

Объект транс-фекции	Код трансфекции (соотношение)	Ожидаемый тип	Выявленные			Выявленные половинные		Другие (%)
			AA (%)	AC (%)	CC (%)	A (%)	C (%)	
XIII+XVI	ZO (1:1)	AC	0	69	7	24	0	0
	ZT (3:1)	AC	10	45	16	27	0	0
	ZU (1:1)	AC	5	61	10	13	0	0
	ZV (1:3)	AC	3	61	23	13	0	0
	ZW (1:1)	AC	0	88,3	2,4	7	0	2,3
XIV+XVII	ZP	AC	30	52	13	0	0	5
XII+XVIII	ZQ	AC	4	51	33	2	1	8
XV+XIX	ZR	AC	20	42	11	0	1	26
XI+XX	ZS	AC	34	41	15	0	0	10

Комбинации вариантов CH3 экспрессировали и анализировали в SDS-PAGE (данные не представлены) и в нативной масс-спектрометрии (MS). Результаты обобщенно представлены в табл. 10. Трансфекция ZO приводила к наиболее высокой доле гетеродимеров в смеси (69% AC). Интересно, что при трансфекции ZO, гомодимер AA не присутствовал, в то время как гомодимер CC составлял небольшую долю (7%). Масс-спектроскопический анализ показал, что оставшийся белок в смеси состоял из половинной молекулы А, вероятно вследствие неравной экспрессии тяжелых цепей А и С. Исходные данные MS для образцов трансфекции ZO представлены на фиг. 8.

Неожиданно, в то время как трансфекция ZO приводила к значительным количествам биспецифического продукта, пара с обращенным зарядом при трансфекции ZP (L351K/T366'D против T366K/L351'D для ZO) не привела к сходным результатам, и наблюдали только 52% биспецифического продукта с присутствием значительных количеств двух гомодимеров (30% AA и 13% CC). Это может быть объяснено тем, что отрицательно заряженный D структурно высоко сходен с T, таким образом, сама по себе замена T366D может не быть достаточно эффективной для отталкивания, и, таким образом, T366D все еще образуют гомодимеры, что и наблюдалось в действительности.

Можно предположить, что несущественно отличающиеся варианты вновь выявленной пары T366K/L351'D (например, при исследовании всех перестановок, включающих новые конструкции T366R и L351E), может приводить к сходным процентам BsAb.

Пример 14. HADDOCK для конструирования новых мутантов CH3 для обеспечения эффективной гетеродимеризации.

Как описано в примере 13, вновь выявленная зарядовая пара T366K/L351'D увеличивает долю гетеродимеров в смеси (69%) с минимальной долей нежелательных гомодимеров CC (7%) (L351D/L351'D) и существенной долей половинных молекул А (24%), являющихся примесями в смеси. В этом примере использовали подход *in silico*, чтобы далее выявить аминокислотные остатки, вовлеченные во взаимодействия на поверхности контакта CH3, для исследования дополняющих замен в противоположных областях CH3 и для поиска новых пар CH3, содержащих комплементарные замены, которые далее увеличивают эффективную гетеродимеризацию, одновременно предотвращая эффективное образование гомодимеров двух тяжелых цепей.

HADDOCK (обусловленная высокой степенью неоднозначности состыковка белок-белок) представляет собой подход опосредуемой информацией гибкой состыковки для моделирования биомолеку-

лярных комплексов. HADDOCK отличается от способов состыковки с нуля тем, что в нем закодирована информация из идентифицированных или предсказанных поверхностей контакта белков в нечетких границах взаимодействия (AIR) для обеспечения процесса состыковки. (de Vries et al., 2010).

Входные данные для web-сервера HADDOCK состоят из файла белковой структуры, которая может представлять собой кристаллическую структуру, структуру ЯМР или смоделированную структуру. После состыковки или детализации, HADDOCK выдает так называемый показатель HADDOCK, который представляет собой средневзвешенное значение ван-дер-ваальсовой энергии, электростатической энергии, площади погруженной поверхности и энергии десольватации. Показатель HADDOCK можно интерпретировать как показатель энергии связывания или аффинности, даже несмотря на то, что прямого перехода к экспериментальным данным часто трудно достигнуть. В дополнение к этому, HADDOCK предоставляет файлы со структурами для "наилучших четырех" структур, полученных в результате проведения состыковки. Эти файлы со структурами можно загрузить и визуализировать, позволяя детальный анализ взаимодействий индивидуальных остатков.

В этом примере исследовали взаимодействия между СН3-доменами тяжелых цепей IgG1. Кристаллическую структуру высокого разрешения для Fc-части IgG (структура 1L6X) использовали в качестве исходной структуры (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=116x>; Idusogie, E.E. et al., J.I. 2000(164)4178-4184).

В примере 13 было выявлено, что котрансфекция векторов XIII и XVI приводила к образованию примеси гомодимера CC (табл. 10). HADDOCK использовали для поиска дополнительных мутаций к паре T366K/L351'D, которые препятствуют гомодимеризации.

Выходные данные HADDOCK состоят из набора вычисленных энергий, показателя HADDOCK (который представляет собой средневзвешенное значение для энергий) и четыре файла со структурами, соответствующие четырем структурам с наиболее низкой энергией, выявленным программой. Показатели HADDOCK используют для сравнения различных структур; другие энергии используют только для получения информации о том, что происходит в структурах (например, хорошие электростатические взаимодействия, меньшая погруженная поверхность, высокая ван-дер-ваальсова энергия). Чем ниже показатель HADDOCK, тем лучше. Для каждой пары мутаций вычисляли показатели для димеров AA, AB и BB.

Наборы пар мутаций из примера 12 анализировали в HADDOCK, чтобы видеть, коррелируют ли вычисленные энергии с экспериментальными данными. В табл. 11 представлены все теоретические энергии, которые визуализированы на фиг. 9.

Таблица 11

Комбинации конструкций	Показатель HADDOCK	Энергия VdW	Электростатическая энергия	Энергия десольватации	Площадь погруженной поверхности
дикий тип-дикий тип	-208,2	-62,8	-773	9,2	2505,8
1-2 (E356KD399K - K392DK409D)	-225,8	-56,4	-862	3	2458,3
2-2 (K392DK409D - K392DK409D)	-180,3	-67,9	-562,1	0,1	2312,5
1-1 (E356KD399K - E356KD399K)	-176,7	-75,5	-469,3	-7,3	2349,6
1-3 (E356KD399K - K392DK409DK439D)	-220,6	-67,9	-793,8	6,1	2499,8
3-3 (K392DK409DK439D - K392DK409DK439D)	-150,1	-76,6	-387,6	4,1	2261,2
6-7 (T366W - T366SL368AY407V)	-221,3	-65,8	-735,5	-8,3	2509,0
6-6 (T366W - T366W)	1916,9*	2072,3	-681,3	-19,2	2499,9

7-7 (T366SL368AY407V - T366SL368AY407V)	-191,9	-55,0	-683,2	-0,2	2427,2
43-63 (T366K - L351D)	-210,6	-64	-758,4	5,1	2456,5
43-43 (T366K - T366K)	-191,7	-71,2	-634,1	6,3	2533,5
63-63 (L351D - L351D)	-212,5	-60,4	-774	2,6	2445,6

* Эта величина является необычно высокой вследствие высокого показателя ван-дер-ваальсовой энергии, возможно вследствие пространственного столкновения в случае T366W/T366'W

В случае 2 доменов СНЗ дикого типа, показатели HADDOCK являются одинаковыми для AA, AB и BB, поскольку области СНЗ А и В являются идентичными. В большинстве других случаев пара АВ имеет наиболее низкий показатель, который является таким, как и ожидается. Для пары T366K/L351D показатель ВВ немного лучше, чем показатель АВ (-210,6 против -212,5), однако это отличие находится в пределах ошибки вычислений. С использованием HADDOCK визуализировали структуры гетеродимеров этих пар. Например, комбинации конструкций 1-2, 1-1 и 2-2 представлены на фиг. 10. Исходя из этой визуализации, очевидно, что в гетеродимере образуются солевые мостики (фиг. 10А, левая панель), в то время как между остатками идентичных цепей происходит электростатическое отталкивание (фиг. 10В и 10С, средняя и правая панель). Таким образом, более высокие показатели HADDOCK могут быть объяснены электростатическим отталкиванием мутантных остатков поверхности контакта. Эти остатки должны отворачиваться друг от друга и не взаимодействуют с остатками на другой цепи, вызывая снижение аффинности.

В табл. 11 и на фиг. 9 подтверждено то, что наблюдали в примере 13. Гетеродимер АС T366K/L351'D и гомодимер СС L351D/L351'D образуются со сходной энергией, что объясняет присутствие как гетеродимера, так и гомодимера, в смеси. Гомодимер АА T366K/T366'K, с другой стороны, практически не поддается обнаружению в смеси, хотя присутствуют половинные молекулы А T366K. В табл. 11 и на фиг. 9 действительно показано, что показатель HADDOCK для гомодимера гомодимер АА T366K/T366'K является более высоким, чем показатель для гетеродимера АС; таким образом, образование этого гомодимера энергетически менее выгодно.

Пример 15. Варианты 366/351.

В примере 13 предполагается, что могут быть сконструированы альтернативы для пары зарядовых мутантов T366K/L351'D, которые могут иметь сходные результаты в значениях процента биспецифических антител в смеси. Альтернативы могут включать замены T366R, T366D, T366E, L351E, L351K и L351R. Доля гомодимеров СС L351D/L351'D может быть уменьшена путем создания вариантов пары 366/351. Все возможные пары мутаций анализировали в HADDOCK и полученные показатели представлены в табл. 12 и визуализированы на фиг. 11.

Таблица 12

Комбинации конструкций	Показатель HADDOCK	Энергия VdW	Электростатическая энергия	Энергия десольватации	Площадь погруженной поверхности
T366K - L351D	-210,6	-64	-758,4	5,1	2456,5
T366K - T366K	-191,7	-71,2	-634,1	6,3	2533,5
L351D - L351D	-212,5	-60,4	-774	2,6	2445,6
T366K - L351E	-216,9	-55,7	-854,7	9,8	2532,7
L351E - L351E	-217,9	-65,5	-802,2	8	2532
T366R - L351D	-210,5	-68,8	-760,8	10,4	2514,5
T366R - T366R	-201,8	-77,4	-626,4	0,9	2608
T366R - L351E	-225,8	-56,2	-874,8	5,4	2579,2
T366D - L351R	-211,2	-71,3	-723,6	4,8	2455,6
T366D - T366D	-198,1	-58,1	-713,4	2,1	2477
L351R - L351R	-220,7	-75,5	-806,5	16,1	2552,2
T366D - L351K	-223,9	-62,1	-810,1	0,3	2487,8
L351K - L351K	-224,4	-75,6	-812,1	13,6	204,5
T366E - L351R	-222,3	-69	-783	3,4	2557,2
T366E - T366E	-201,9	-57,6	-741	4	2487,5
T366E - L351K	-215,9	-58,4	-808,9	4,3	2486

При изучении показателей HADDOCK было выявлено, что некоторые из мутаций имеют сходный

"характер" при сравнении с T366K/L351'D. Для большинства перестановок было выявлено, что гомодимер AA имеет более высокий показатель HADDOCK, чем гетеродимер AB, однако гомодимер BB оказался настолько же выгодным, как и гетеродимер AB. Даже несмотря на то, что известно, что остаток 351 является "соседним" для него же самого на другой цепи, т.е. остаток 351 цепи A образует пару с остатком 351 цепи B на поверхности контакта СН3-СН3, практически не существует отрицательного влияния идентичных зарядов, когда образуется димер BB. При рассмотрении структуры L351D/L351'D это объясняется аспарагиновыми кислотами отклоняющимися друг от друга, и стабилизирующим влиянием по меньшей мере встречающегося в природе аргинина в положении 355 и также некоторой стабилизацией отрицательного заряда встречающимся в природе остатком серина в положении 354 (см. фиг. 12А). Мутация этих остатков (S354A и R355D) обеспечивает только небольшое усовершенствование. Из фиг. 12В понятно, что водород остова A354 вызывает стабилизацию гомодимера. Из этой серии пара T366R/L351'E, по-видимому, является наиболее выгодной с наименьшим показателем HADDOCK для биспецифической молекулы.

Пример 16. Мутации в области T366K/L351'D.

В серии анализов HADDOCK в этом примере пары T366K/L351'D или T366K/L351'E были взяты в качестве исходной структуры. Для идентификации дополнительных мутаций, которые далее могут увеличить предсказанный процент биспецифических молекул этих цепей A и B, дополнительные мутации на B-цепи использовали для вычисления показателей HADDOCK и энергий. При исследовании структуры СН3-домена с использованием программы для визуализации структур белков на молекулярном уровне (YASARA, www.yasara.org), можно вычислять расстояния между индивидуальными остатками. При этом было выявлено, что два остатка, Y349 и L368, являются соседними остатками, которые могут вносить положительный или отрицательный вклад во взаимодействия димеров, и в них вносили мутации в этом примере (в дополнение к мутации L351D) для исследования результата образования димера для гомо- и гетеродимеров (см. фиг. 13). Оба остатка по-видимому, способствовали стабильности гетеродимера (более низкие показатели HADDOCK), а также дестабилизации димера BB (более высокие показатели HADDOCK). Глутаминовые кислоты (E) в положениях 349 и 368, по-видимому, являются более выгодными, чем аспарагиновые кислоты (D). Таким образом, внесение второй аминокислотной замены в B-цепь, уже содержащую аминокислотную замену в положении 351, по-видимому, еще более способствует гетеродимеризации.

В следующей группе анализов HADDOCK вновь в качестве исходной структуры брали пару T366K/L351'D. В дополнение к заменам в B-цепи, которые далее увеличивают гетеродимеризацию (т.е. Y349D/E и L368E), к A-цепи, которая уже содержит замену T366K, добавляли дополнительные мутации. Как показано на фиг. 14, существует несколько пар мутаций, которые, по-видимому, способствуют образованию биспецифических гетеродимеров. В паре T366K-L351K/L351'D-Y349'D все четыре мутантных остатка вовлечены в образование гетеродимерной пары, чего не происходит в случае T366K-L351K/L351'E-L368'E, где K351 не вовлечен прямо в связывание. Однако показатель HADDOCK для этого последнего гетеродимера равен -228,9; что значительно ниже чем -214,2 для T366K/L351'E-L368'E, что может быть объяснено взаимодействиями с образованием водородных связей K в положении 351 (см. фиг. 15). Пара T366K-L351K/L351'D-Y349'D может быть далее улучшена мутацией R355'D в B-цепи, что приводит к более высокому показателю HADDOCK для BB, однако также показатель HADDOCK для AB является несколько более высоким. В целом, дополнительный L351K приводит к более низким показателям для AB и сходным показателям для AA и BB при сравнении с единственной мутацией T366K в A-цепи. Теоретически, это должно привести к более высоким количествам биспецифических гетеродимеров в образцах.

Из фиг. 11 очевидно, что наличие R вместо K в положении 366 может быть более эффективным в отношении обеспечения гетеродимеризации. Таким образом, некоторые из анализов HADDOCK, представленных на фиг. 13 повторяли, однако теперь с T366R вместо T366K в A-цепи. Было продемонстрировано, что не является выгодным комбинирование R366 в A-цепи с двойными мутациями в B-цепи (фиг. 16). Это может быть следствием крупных размеров этого остатка, препятствующего другим взаимодействиям поверхности контакта, даже несмотря на то, что в структурах присутствуют ожидаемые солевые мостики с R366. Также показатель HADDOCK для гомодимера AA является более низким в случае R366, чем в случае K366, что также не вносит положительного вклада в образование гетеродимера. Таким образом, не проводили дальнейших анализов HADDOCK с использованием R366 на поверхности контакта.

Было выбрано всего 14 пар с наилучшими характеристиками в соответствии с прогнозированием HADDOCK (см. табл. 13 и фиг. 17). В некоторых парах включена замена R355D для устранения стабилизирующего влияния встречающегося в природе R355 на взаимодействие L351/L351'D.

Таблица 13

Комбинации конструкций	Показатель	Показатель	Показатель
	AB HADDOCK	AA HADDOCK	BB HADDOCK
дикий тип - дикий тип	-208,2	-208,2	-208,2
T366K - L351D	-210,6	-191,7	-212,5
T366K - L351E	-216,9	-191,7	-217,9
T366R - L351E	-225,8	-201,8	-217,9
T366E - L351R	-222,3	-201,9	-220,3
T366K - L351DY349E	-215,9	-191,7	-190
T366K - L351DL368E	-223,3	-191,7	-198,9
T366K - L351EY349E	-214,5	-191,7	-187,5
T366KL351K - L351D	-233,2	-205	-212,5
T366K - L351DY349EL368E	-207,5	-191,7	-179,5
T366KL351K - L351DY349D	-255,2	-205	-204,3
T366KL351K - L351DY349E	-227,2	-205	-190
T366KL351K - L351DL368E	-243,9	-205	-198,9
T366KL351K - L351DR355D	-233,6	-205	-211,9
T366KL351K -	-242,8	-205	-183,5
L351DY349DR355D			
T366D - L351KY349K	-237,9	-198,1	-228,4

Пример 17. Экспрессия *in vitro* биспецифических молекул с использованием мутантов СНЗ на основе прогнозирования HADDOCK.

Анализ в примере 16 показал, что некоторые варианты СНЗ с дополнительными мутациями в области пары T366K/L351'D должны привести к смесям с высоким содержанием биспецифического компонента и потенциально более низким содержанием гомодимерного компонента. Эти пары с наилучшей эффективностью отбирали для продукции и дальнейшего анализа. Кроме того, также получали конструкции T366R и L351E. В табл. 14 приведены конструкции, которые были получены и которые использовали для повторного клонирования VH-областей антитела с известной специфичностью и известной способностью образовывать пару с легкой цепью IGKV1-39 человека. Экспрессия IgG, которые содержат индивидуальные конструкции, ранее была описана в примере 13, и она была описана для конструкций, приведенных в табл. 14. Целью была оценка того, какие конструкции гомодимеризуются в отсутствие соответствующего партнера по гетеродимеризации. В идеальном случае, должны образовываться высокие проценты половинных молекул и низкие проценты гомодимеров. В качестве контроля также использовали конструкции, содержащие ранее описанные зарядовые мутации, и конструкции, содержащие ранее описанные мутации "выступ-в-полости" также использовали для экспрессии в качестве целого IgG рекомбинантными клетками. Очищенные с белком А супернатанты анализировали в SDS-PAGE; результаты анализировали и оценивали, как показано в табл. 14.

Таблица 14

Замены AA в СНЗ	# конструкции	% IgG	% ПОЛОВИННЫХ молекул
E356K, D399K	1	64,2	35,8
K392D, K409D	2	30,9	69,1
K392D, K409D, K439D	3	24,5	75,5

T366W	6	27,6	72,4
T366S, L368A, Y407V	7	58,6	41,4
7T366K	43	32,9	67,1
L351D	63	89,8	10,2
T366D	64	89,6	10,4
T366K, L351K	68	34,7	65,3
L351D, L368E	69	83,7	16,3
L351E, Y349E	70	67,8	32,2
L351D, Y349E	71	79,7	20,3
L351D, R355D	72	100	-
L351D, Y349E, L368E	73	79,3	20,7
L351D, Y349D	74	88,6	11,4
L351D, Y349D, R355D	75	89,9	10,1
L351K, L368K	76	56,6	43,4
L351R	77	100	-
T366E	78	44,4	55,6
T366R	79	29,6	70,4
L351E	80	100	-

Результаты коэкспрессии общей легкой цепи и двух различных тяжелых цепей, содержащих аминокислотные замены в конструкциях, представленных в табл. 14, или тяжелых цепей, содержащих аминокислотные замены предшествующих конструкций, представлены в табл. 15. Экспрессия двух различных тяжелых цепей, содержащих аминокислотные замены T366K и L351'D:L368'E, соответственно, привела приблизительно к 87% биспецифического гетеродимера АВ в смеси без присутствия гомодимеров АА или ВВ (комбинация номер 3 в табл. 15). Наблюдали приблизительно 12% половинных молекул (половинный А), содержащих замену T366K. Более того, было выявлено, что процент биспецифического гетеродимера АВ возрастал, когда в первую тяжелую цепь вносили дополнительную аминокислотную замену L351K. Например, коэкспрессия двух различных тяжелых цепей, содержащих аминокислотные замены T366K:L351K и L351'D:L368'E, соответственно, привела приблизительно к 92% биспецифического гетеродимера АВ, в то время как гомодимеры АА и ВВ по существу отсутствовали в смеси (комбинация номер 12 в табл. 15). Комбинации 10 и 11 также приводили к благоприятным распределениям высоких процентов гетеродимеров и практически к отсутствию гомодимеров. Отсутствие гомодимеров является преимущественным, поскольку фракция, содержащая интактные молекулы IgG, содержит только гетеродимеры АВ. Для очистки и последующего терапевтического применения половинные молекулы могут быть удалены с помощью стандартных подходов, таких как эксклюзионная хроматография. Таким образом, использование этих вновь идентифицированных зарядовых мутантов в процессе получения биспецифических антител обеспечивает преимущества над известными зарядовыми мутантами и мутантами типа "выступ-в-полости", где присутствие "примесей" гомодимерных антител не исключено. Кроме того, зарядовые пары T366K/L351'D:L368'E и T366K:L351K/L351'D:L368'E имеют дополнительное преимущество над ранее описанными парами с обращенным зарядом E356K:D399K/K392'D:K409'D и E356K:D399K/K392'D:K409'D:K439'D, поскольку ранее описанные зарядовые варианты основаны на обращении существующих зарядов на поверхности контакта СН3-СН3, в то время как во вновь идентифицированных зарядовых вариантах добавлены дополнительные зарядовые пары (заряд-зарядовые взаимодействия) на поверхности контакта СН3-СН3. Внесение дополнительных зарядовых пар на поверхности контакта СН3-СН3 может далее увеличить стабильность поверхности контакта и, тем самым всего антитела. Вышеуказанное справедливо для мутаций, используемых в комбинациях номер 4, 5, 6, 9, 10 и 11, которые также приводили к благоприятным долям биспецифического гетеродимера чрезвычайно низкими долями гомодимеров АА и ВВ, присутствующих в смесях.

Таблица 15

Комбинация 2 различных тяжелых цепей	цепь А* / мутации (# конструкции)	цепь В** / мутации (# конструкции)	обнаруженный % АА	обнаруженный % АВ	обнаруженный % ВВ	Обнаруженный % половинного А	Обнаруженный % половинного В
1	T366E (78)	L351R (77)	3	81	2	13	0
2	T366K (43)	L351D (63)	0	88	3	9	0
3	T366K (43)	L351D, L368E (69)	0	87	0	12	0
4	T366K (43)	L351E, Y349E (70)	2	85	0	11	0
5	T366K (43)	L351D, Y349E (71)	2	92	1	5	0
6	T366K (43)	L351D, Y349E, L368E (73)	0	96	1	4	0
7	T366K, L351K (68)	L351D (63)	0	77	12	10	1
8	T366K, L351K (68)	L351D, R355D (72)	0	79	8	10	1
9	T366K, L351K (68)	L351D, Y349D, R355D (75)	1	93	2	4	1
10	T366K, L351K (68)	L351D, Y349D (74)	1	95	1	3	0
11	T366K, L351K (68)	L351D, Y349E (71)	1	95	0	3	1
12	T366K, L351K (68)	L351D, L368E (69)	0	92	0	8	0
13	T366K (43)	L351E (80)	0	70	10	18	2
14	T366R (79)	L351E (80)	4	38	36	21	1
15	T366D (64)	L351K, L368K (76)	3	92	2, 5	2, 5	0
16	T366D (64)	L351R (77)	30	69	1	0	0

* А-цепь имеет специфичность MF1337 (=столбчатый токсид).

** В-цепь имеет специфичность MF1122 (=фибриноген).

Нативная MS.

Нативную MS проводили для всех биспецифических образцов. Полученные графики анализировали для определения относительной доли присутствующего типа двумя путями: по высоте пика и по площади пика. Площадь пика является наиболее правильным с научной точки зрения способом анализа, однако поскольку все предшествующие анализы в других исследованиях проводили на основе высоты пика, в анализ были включены оба способа для целей сравнения. Различия между способами находились в пределах погрешности измерения, и, таким образом, для последующих измерений использовали только величины площади пика. Два типичных спектра представлены на фиг. 18. Обобщение результатов представлено графически на фиг. 19, числовые величины могут быть найдены в табл. 15. Приблизительно в половине образцов общее содержание примесей моноспецифического IgG составляет менее 5%, и только в трех случаях оно составляет >10%, в то время как для IgG wt ожидается обнаружить приблизительно 50% моноспецифического IgG в смеси.

Панель из десяти комбинаций 2 различных цепей была выбрана из табл. 15 для дальнейшего анализа. Эти десять комбинаций включали комбинации 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11 и 12 (табл. 15). Выбор этих десяти комбинаций был основан на низких процентах гомодимеров, присутствующих в смеси, при определении с помощью nMS, однако также он основан на их общих физико-химических свойствах, включая выход продукции, SDS-PAGE, а также количество мутаций, присутствующих в CH3-домене.

Пример 18. Анализы стабильности IgG.

В этом исследовании далее анализируют серию пар мутаций CH3, которые приводят к высоким долям биспецифических гетеродимеров во фракции целых IgG и к очень низким количествам (<5%) исходных IgG, в отношении стабильности Fc-части молекулы IgG. Мутантные CH3-домены, которые используют для обеспечения гетеродимеризации тяжелых цепей, могут иметь неожиданные дестабилизирующие эффекты на Fc-область IgG, которые могут привести к нежелательным свойствам, таким как уменьшение времени полужизни *in vivo*, снижение эффекторной функции и/или увеличение иммуногенности. Вновь идентифицированные зарядовые пары сравнивают с биспецифическими молекулами дикого типа и биспецифическими молекулами, содержащими ранее идентифицированные зарядовые мутации (цепь А, содержащая конструкцию 1, и цепь В, содержащая конструкцию 2). Все биспецифические конструкции в этом исследовании содержат одинаковые варибельные области тяжелых и легких цепей, что гарантирует то, что наблюдаемые эффекты вызваны мутациями в Fc-части молекулы, а не варьированием вари-

бельных областей.

Для этих биспецифических молекул проводят серию исследований стабильности. Эти исследования включают спектроскопические (поглощение в ультрафиолетовой и видимой области, флуоресценция и рассеяние света) и микроскопические (световая и флуоресцентная микроскопия с окрашиванием Nile Red) анализы, которые обеспечивают информацию о состоянии агрегации вариантов CH3.

Спектры поглощения в ультрафиолетовой и видимой области регистрируют с помощью двулучевого спектрофотометра с двумя монохроматорами Cary 300 Bio при 25°C. Мониторинг спектров проводят при от 250 до 400 нм с использованием длины пути 1 см. Поглощение при длине волны 320 нм и более обеспечивает информацию о состоянии агрегации IgG.

Мониторинг спектров собственной флуоресценции проводят при 25°C с использованием спектрофотометра FluoroMax. Способ флуоресценции оптимизируют. Испускание флуоресценции обеспечивает информацию о конформации и свойствах агрегации.

Мониторинг спектров рассеяния света при 90° проводят при 25°C с использованием спектрофотометра FluoroMax путем проведения синхронного сканирования ($\lambda_{em} = \lambda_{ex}$) между 400 и 750 нм со временем интегрирования 0,01 с. Щели для возбуждения и испускания оптимизируют. Например, рассеяние света под прямым углом может различить образцы IgG, которые не имеют димеров и имеют 5% димеров.

Для флуоресцентной микроскопии с окрашиванием Nile Red, непосредственно перед измерениями к образцу добавляют Nile Red в этаноле. Образцы заливают на предметном стекле и анализируют с помощью флуоресцентной микроскопии. Частицы подсчитывают. Нижний предел размера частиц, который может быть выявлен с помощью флуоресцентной микроскопии, составляет приблизительно 0,5 мкм.

Применение стрессового воздействия, такого как температура, pH, механическое воздействие или денатурирующие вещества, к белкам может привести к изменению конформации (например, разворачиванию) и/или агрегации. Как сообщалось ранее, биспецифические антитела с модифицированными способами инженерии зарядом имеют сниженную температуру плавления модифицированного CH3 (Gunasekaran 2010), целью этих исследований является различение новых зарядовых мутантов по настоящему изобретению и существующих известных зарядовых мутантов.

Проводят исследования термостабильности с использованием Octet, как с помощью биосенсоров с белком A, так и с использованием связывания FcRn с IgG. Для исследования температурной стабильности IgG с модифицированными способами инженерии CH3 образцы инкубируют в концентрации 100 мкг/мл (в PBS) при 4, 50, 55, 60, 65, 70 и 75°C в течение 1 ч с использованием устройства для ПЦР. После этого образцы медленно охлаждают в течение 15 мин до 25°C и держат при этой температуре в течение 2 ч, после чего их хранят в течение ночи при 4°C. Преципитировавшие антитела удаляют центрифугированием, после чего определяют общую концентрацию IgG в растворимых антителах с помощью Octet с использованием биосенсора с белком A (разведение в PBS 1/10). Проводят анализы, которые измеряют связывание IgG, имеющего модифицированный способом инженерии CH3, с FcRn с использованием Octet. Используют либо биосенсоры с белком L для связывания легкой цепи IgG с биосенсором с последующей инкубацией с FcRn в растворе, либо биосенсоры с антителом против пента-HIS для связывания His-меченного белка FcRn, а затем проводят инкубацию с представляющим интерес IgG. Эти способы могут быть более чувствительными, чем использование биосенсора с белком A, и их также можно использовать для исследований температурной стабильности.

Все образцы также анализируют в отношении стабильности в сыворотке. В кратком изложении (модифицированные способами инженерии) образцы IgG инкубируют при 37°C в сыворотке человека, контрольные образцы поддерживают при 4°C. Через 1, 2, 3 и 4 недели образцы центрифугируют для удаления преципитировавшего IgG. Затем образец титруют в антигенспецифическом ELISA для определения относительных количеств функционального IgG. Очищенное контрольное антитело, в которое добавлена свежая сыворотка человека, используют в качестве эталона.

Пример 19. Анализы стабильности.

В предшествующих экспериментах получали высокие проценты биспецифических антител посредством коэкспрессии двух различных тяжелых цепей, содержащих мутации CH3, и общей легкой цепи (пример 17).

Панель из восьми комбинаций из 2 различных тяжелых цепей была выбрана из табл. 15 для дальнейшего анализа. Эти восемь комбинаций включали комбинации 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11 и 12 (табл. 15). В этом исследовании эти восемь комбинаций анализировали, обращая особое внимание на стабильность Fc-части IgG. В качестве контролей включали биспецифические молекулы дикого типа (т.е. без мутаций CH3) и/или биспецифические молекулы на основе ранее сообщенных зарядовых мутаций CH3. Следует отметить, что для биспецифических молекул дикого типа 2 тяжелых цепи и общую легкую цепь коэкспрессируют без средств для преимущественного смещения в сторону гетеродимеров. Эти "биспецифические молекулы" дикого типа, таким образом, представляют собой смесь AA, AB и BB. Все биспецифические молекулы в этом исследовании конструировали так, чтобы они имели те же комбинации VH/VL, что гарантирует, что наблюдаемые эффекты вызваны мутациями в Fc-части молекулы, а не варьированием Fab-частей.

Было предположено, что пары мутаций, которые использовали для обеспечения образования гете-

родимерных пар двух различных тяжелых цепей, могут ассоциировать с неожиданными структурными или иными дестабилизирующими эффектами на Fc-область IgG. Это впоследствии может привести к проблемам, которые могут препятствовать дальнейшей клинической разработке, таким как уменьшение времени полужизни *in vivo*, уменьшение эффекторной функции и/или увеличение иммуногенности вследствие присутствия этих мутаций.

Термостабильность.

Применение стрессового воздействия, такого как увеличение или уменьшение температуры, может привести к конформационному изменению (например, разворачиванию) и/или агрегации белков. Для исследования термической стабильности IgG с модифицированными способами инженерии СНЗ, биспецифические молекулы с комбинациями 3-6 и 9-12 (табл. 15), а также биспецифические молекулы дикого типа и биспецифические молекулы, полученные с использованием конструкций 1 и 2 (комбинация E356K:D399K/ K392D':K409D', также называемая парой "с обращенным зарядом") инкубировали в концентрации 100 мкг/мл (в PBS) при 4, 60, 62,5, 65, 67,5, 70 и 72,5°C в течение 1 ч с использованием устройства для ПЦР. После этого образцы медленно охлаждали в течение 15 мин до 25°C и держали при этой температуре в течение 2 ч, после чего их хранили в течение ночи при 4°C. На следующие сутки преципитировавшие антитела удаляли центрифугированием (18000 об/мин; 4°C, 20 мин), после чего определяли общую концентрацию IgG с помощью Octet с использованием биосенсора с белком А (разведение 1/10 в PBS). Результаты представлены на фиг. 20. Было выявлено, что контрольное биспецифическое антитело с модифицированными способами инженерии СНЗ (комбинация с обращенным зарядом E356K:D399K/ K392D':K409D' (треугольники)) имеет сниженную термическую стабильность по сравнению с биспецифическими молекулами дикого типа (квадраты). Биспецифические молекулы с комбинациями 3-6 и 9-12 (ромбы) также продемонстрировали уменьшенную термическую стабильность по сравнению с диким типом. Однако примечательно, что три комбинации продемонстрировали увеличенную стабильность по сравнению с контрольным биспецифическим антителом с модифицированными способами инженерии СНЗ. Биспецифические молекулы с комбинациями 9, 10 и 11 являются значительно более стабильными, чем другие биспецифические молекулы с модифицированными способами инженерии СНЗ (с обращенным зарядом), и они являются настолько же стабильными, как и биспецифические молекулы дикого типа, при наиболее высокой измеренной температуре. Стабильность при замораживании-размораживании. Для исследования стабильности IgG с модифицированными способами инженерии СНЗ при повторяющемся замораживании и размораживании биспецифические молекулы из комбинаций 3-6 и 9-12 (табл. 15), а также биспецифические молекулы дикого типа и биспецифические молекулы, полученные с использованием конструкций 1 и 2 (комбинация E356K:D399K/ K392D':K409D' (пара с обращенным зарядом)) подвергали воздействию десяти последовательных циклов замораживания-размораживания, помещая образцы в условия -80°C в течение по меньшей мере 15 мин до тех пор, пока они не заморозятся полностью. После этого образцы размораживали при комнатной температуре. Когда они были полностью разморожены, цикл замораживание-размораживание повторяли. После 10 циклов замораживание-размораживание, преципитировавшие антитела удаляли центрифугированием (18000 об/мин; 4°C, 20 мин), после чего определяли общую концентрацию растворимых IgG-антител с помощью Octet с использованием биосенсора с белком А (разведение 1/10 в PBS). Исследование стабильности при замораживании-размораживании повторяли три раза. Результаты представлены на фиг. 21. Было выявлено, что контрольное биспецифическое антитело с модифицированными способами инженерии СНЗ с обращением заряда, по-видимому, имеет несколько сниженную стабильность по сравнению с биспецифической молекулой дикого типа. Напротив, биспецифические молекулы из комбинаций 3, 4 и 9, по-видимому, имеют несколько увеличенную стабильность по сравнению с биспецифическим контролем дикого типа. В целом, можно заключить, что строгие условия циклов замораживания-размораживания не приводят к значительным проблемам стабильности для вариантов с модифицированными способами инженерии СНЗ.

Стабильность в сыворотке *in vitro*.

Для исследования стабильности IgG с модифицированными способами инженерии СНЗ в сыворотке при 37°C, биспецифические молекулы из комбинаций 3-6 и 9-12 (табл. 15), а также биспецифические молекулы дикого типа и биспецифические молекулы с обращением заряда инкубировали при 37°C в сыворотке человека 10%. Контрольные образцы держали в сыворотке человека при 4°C. Через 1, 2 или 5 суток преципитировавшие антитела удаляли центрифугированием. После этого образцы титровали в фибриноген-специфическом ELISA для определения относительных количеств функционального IgG. Очищенное контрольное антитело, в которое была добавлена свежая сыворотка человека, использовали в качестве эталона.

Данные ELISA с фибриногеном продемонстрировали, что все образцы были довольно стабильными в 10% сыворотке человека при 37°C в течение 5 суток. При более низкой концентрации IgG биспецифические молекулы с комбинациями 4 и 5, по-видимому, были несколько менее стабильными, особенно в моменты T=1 и T=2, однако в конце этого эксперимента различие является минимальным (см. фиг. 22).

Пример 20. Дальнейшее исследование стабильности.

Дальнейшую серию аналитических способов использовали для оценки стабильности вариантов IgG. Биспецифические молекулы с комбинациями 3-6 и 9-12 (табл. 15), а также биспецифические молекулы

дикого типа (AA, AB, BB), индивидуальные родительские антитела (AA и BB) и биспецифические молекулы, полученные с использованием конструкций 1 и 2 (комбинация E356K:D399K/K392D':K409D' (пара с обращением заряда)) использовали в качестве образцов в этих анализах стабильности.

Все IgG разбавляли до 0,2 мг/мл и использовали несколько условий стрессового воздействия (2 суток при 50°C, 2 недели при 40°C, 5х замораживание-размораживание), с целью иметь способность различить различные образцы. Следует отметить, что эти высокие уровни стрессового воздействия обеспечивали условия, в которых одно из родительских антител (родительское антитело BB, имеющее две Fab 1122), используемых во всех биспецифических молекулах, стало нестабильным. Через 2 суток при 50°C была выявлена агрегация этого белка по поглощению в УФ-области. Это позволило предположить, что эти стрессовые условия не позволяют различить нестабильность Fab и СН3 в биспецифической молекуле, и данные, полученные при инкубации при 50°C, следует использовать осторожно.

Результаты обобщенно представлены в табл. 16. Аналитические способы, которые использовали, включали следующие:

флуоресцентная микроскопия с Nile Red ("частицы Nile Red" в табл. 16); для выявления количества частиц >0,5 мкм после добавления красителя Nile Red;

УФ-спектрометрия при 350 нм ("УФ, 350 нм"); изменение поглощения при длинах волн >320 нм дает информацию о состоянии агрегации белка;

рассеяние света при 90° при 400 нм ("LS, 400 нм"); чувствительный способ выявления изменений агрегации белка, например, отличий между мономерами и димерами IgG;

собственная флуоресценция; максимальная длина волны флуоресценции и интенсивность ароматических остатков в белке изменяется при изменениях окружающих условий (например, разворачивание);

флуоресцентная спектроскопия 1,8-ANS; 1,8-ANS связывается посредством электростатических взаимодействия с катионными группами через образование ионных пар, и можно выявлять изменения структуры и/или конформации белка.

Спектроскопия в ультрафиолетовой и видимой области спектра Спектры поглощения в ультрафиолетовой и видимой области спектра измеряли при 25°C с помощью двулучевого спектрофотометра с двумя монохроматорами Cary 300 Bio от Varian в различных кварцевых кюветках (таких как черные кюветы низкого объема Hellma с длиной пути 1,0 см и прозрачные кюветы Hellma 0,2×1,0 см). Мониторинг спектров проводили между 220 и 450 нм с использованием длины пути 1,0 см. Поглощение в области 280 нм обеспечивает информацию о концентрации белка. Область между 320 и 450 нм может обеспечить информацию о состоянии агрегации в образце.

Рассеяние света при 90°.

Спектроскопия рассеяния света при 90° была разработана для исследования агрегации белка и ее проводили, как описано в Capelle, 2005; Demeule, 2007a. Мониторинг спектров рассеяния света при 90° проводили при 25°C с использованием спектрофотометра FluoroMax (Spex, Instruments S.A., Inc. U.K.) путем проведения синхронного сканирования ($\lambda_{em}=\lambda_{ex}$) между 400 и 750 нм со временем интеграции 0,01 с. Исследовали различные параметры щели, чтобы найти оптимальные условия. После оптимизации для всех измерений использовали одни и те же параметры щели.

Испускание флуоресценции в стационарном состоянии.

Испускание флуоресценции остатков триптофана, тирозина и фенилаланина дает информацию о локальном окружении этих флуорофоров. Измеряют изменения или отличия гидрофобности и/или жесткости. Как правило, более гидрофобные и жесткие условия приводят к увеличению интенсивности флуоресценции и коротковолновому сдвигу максимума эмиссии. Спектроскопия собственной флуоресценции может обеспечить информацию о текущем состоянии белка и осуществить мониторинг изменений физических и химических свойств. Больше информации о флуоресценции тирозина и триптофана может быть найдено в книге Lakowicz (Lakowicz, 2006).

Спектры испускания и возбуждения флуоресценции регистрировали при 25°C в различных кварцевых кюветках. Возбуждение образцов осуществляли при различных длинах волн. Время интегрирования и параметры щели оптимизировали. После оптимизации для всех образцов использовали то же время оптимизации и параметры щели.

Флуоресцентная микроскопия с окрашиванием Nile Red.

Способ окрашивания с помощью Nile Red был разработан для визуализации агрегатов белка, и его выполняли, как описано в Demeule et al., 2007b.

Микроскопию проводили на микроскопе Leica DM RXE (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Германия), оборудованном ртутной лампой. Изображения получали с помощью камеры Sony NEX-5 и ее встроенных программ. Объективы были 10×, 20× и 40×. Для исследований с помощью микроскопии использовали предметные стекла с фиксированным расстоянием 0,1 мм между предметным и покровным стеклом. Размер решеток 4×4 составляет 1×1 мм и он соответствует 0,1 мкл.

Флуоресцентная спектроскопия с 1,8-ANS.

1-Анилиннафталин-8-сульфоновая кислота (1,8-ANS) представляет собой незаряженный небольшой флуоресцентный зонд (ММ 299,34 Да), используемый для исследования как мембранных поверхностей,

так и белков.

1,8-ANS является по существу нефлуоресцентной в воде и становится ощутимо флуоресцентной, когда она связана с мембранами (квантовый выход ~0,25) с или белками (квантовый выход ~0,7). Это свойство 1,8-ANS делает ее чувствительным индикатором укладки белка, конформационных изменений и других процессов, которые модифицируют экспозицию зонда в воде. Информация о 1,8-ANS может быть найдена на домашней странице Интернет Molecular Probes, www.probes.com.

Спектры испускания флуоресценции 1,8-ANS регистрировали с использованием спектрометра FluoroMax. Прямое сравнение флуоресценции 1,8-ANS между IgG не проводят. Каждый IgG может иметь отличающееся количество участков связывания 1,8-ANS и, таким образом, их нельзя сравнивать. В принципе, чем ниже флуоресценция 1,8-ANS, тем меньше молекул 1,8-ANS связывается с антителом. Оценивают изменения интенсивности флуоресценции 1,8-ANS и длины волны испускания вследствие стрессовых воздействий.

Таблица 16

Обзор различных результатов ускоренной деградации
для различных образцов IgG после разбавления до 0,2 мг/мл

Образец белка	Стрессовое воздействие	Частицы Nile red	УФ, 350 нм	LS 400, нм (10 ⁷ cps)	Собственная флуоресценция		Флуоресценция 1,8-ANS		
					собственная флуоресценция (10 ⁶ имп/с)	λ Max. (нм)	собственная 1,8-ANS (10 ⁶ имп/с)	λ Max. (нм)	Сдвиг (нм)
ВВ	2d4°C	0-10	0.001	0.7	4.2	335			
	2d50°C	0-10	0.013	0.8	4.2	335			
АА	2d4°C	10-20	0	1.2	5.7	338			
	2d50°C	10-20	0.002	1.0	5.5	338			
Биспецифическая молекула дикого типа (АА АВ ВВ)	2d4°C	30-50	0.003	0.9	5.1	336	7.1	507	
	2d50°C	>10000**	0.007	0.9	5.0	336	7.1	507	
	2w4°C		0	0.9	5.0	336			
	2w40°C	>2000**	0	0.8	5.0	336			
	T0		0.001	0.8	5.0	336			
	5FT	>2000**	0.009	1.2	4.8	336			
Биспецифическая молекула с обращенным зарядом (E356K, D399K/ K392D, K409D)	2d4°C	10-20	0.001	1.3	5.9	336	7.0	507	
	2d50°C	10-20	0.002	1.2	5.7	336	7.0	507	
	2w4°C	>2000**	0	1.1	5.5	336			
	2w40°C	>2000**	0.002	1.1	5.5	336			
	T0		0.001	1.3	5.7	336			
	5FT	30-50	0.007	1.8	5.5	336			
Комбинация # 3*	2d4°C	30-50	0	0.9	5.0	337			
	2d50°C	30-50	0.001	0.8	4.9	337			
Комбинация # 4	2d4°C	20-30	0	1.0	6.2	337	7.5	505	
	2d50°C	>3000**	0.001	1.0	6.2	337	7.5	505	
	2w4°C		0.001	1.0	6.3	337			
	2w40°C	>2000**	0.003	0.9	6.3	337			
	T0		0.002	1.1	6.3	337			
	5FT	>2000**	0.003	1.2	6.0	337			
Комбинация # 5	2d4°C	>2000**	0.001	1.1	4.9	337			
	2d50°C	>10000**	0.001	0.9	5.0	337			

Комбинация # 6	2d4°C	10-20	0	0.7	4.3	337			
	2d50°C	20-30	0.001	0.7	4.3	337			
Комбинация # 9	2d4°C	30-50	0	1.0	5.5	337	7.5	507	
	2d50°C	50-100	0	1.0	5.5	337	8.1	500	-7
	2w4°C	>2000**	0	0.9	5.1	337			
	2w40°C	>2000**	0	0.9	5.2	337			
	T0		0.002	0.8	5.1	337			
	5FT	>2000**	0.007	1.4	4.9	337			
Комбинация # 10	2d4°C	30-50	0.002	1.0	5.6	337	7.0	505	
	2d50°C	150-200	0.001	1.1	5.9	337	8.7	499	-6
	2w4°C	>2000**	0	0.9	5.2	337			
	2w40°C	>2000**	0	0.9	5.4	337			
	T0		0.005	1.0	5.3	337			
	5FT	20-30	0.004	1.1	5.4	337			
Комбинация # 11	2d4°C	20-30	0	0.9	4.9	337			
	2d50°C	30-50	0.002	0.9	5.1	337			
	2w4°C	>2000**	0	0.8	5.0	337			
	2w40°C	>2000**	0	0.8	5.1	337			
	T0		0.004	1.1	5.0	337			
	5FT	>2000**	0.002	1.2	5.0	337			
Комбинация # 12	2d4°C	10-20	0.001	0.8	3.8	337	6.2	511	
	2d50°C	10-20	0.002	0.7	3.8	337	6.5	508	-3
	2w4°C	>2000**	0.003	0.6	3.6	337			
	2w40°C	>2000**	0.001	0.5	3.5	337			
	T0		0.005	0.6	3.7	337			
	5FT		0.004	0.7	3.6	337			

Цвет ячеек указывает на варьирование между T=0 и моментом времени после стрессового воздействия:
 темно-серый=большое изменение,
 светло-серый=небольшое изменение, и
 нет цвета=нет изменения (=стабильный).

* "#комбинации" относится к комбинации мутаций, приведенных в табл. 15.

** Очень малые частицы при флуоресцентной микроскопии, значимость этих частиц неизвестна.

2d4°C=2 суток при 4°C.

2d50°C=2 суток при 50°C.

2w4°C=2 недели при 4°C.

2w40°C=2 недели при 40°C.

T0=начало эксперимента.

5FT=5 циклы замораживания-размораживания.

Взяты вместе, эти данные указывают на то, что различные образцы IgG являются в значительной степени стабильными. Требовались условия высокого стрессового воздействия (например, 2 суток при 50°C), чтобы получить поддающиеся измерению различия между исследуемыми образцами. В этих условиях образцы комбинаций #9 и #10 по-видимому, агрегируют больше, чем другие образцы.

Наиболее различающимися факторами для стабильности между белками являются циклы замораживания-размораживания и увеличенная температура. Учитывая очень жесткий стрессовый фактор инкубации при 50°C, варианты T366K/L351E, Y349E (комбинация #4) и T366K, L351K/L351D, Y349E (комбинация #11) являются двумя из наиболее стабильных белков в панели, за которыми близко следуют

T366K,L351K/L351D,Y349D (комбинация #10) и T366K,L351K/L351D,L368E (комбинация #12).

Пример 21. Нативная MS в экспериментах по соотношению; соотношение при трансфекции от 1:5 до 5:1.

Чтобы узнать больше о поведении IgG с мутантным СНЗ в смещенных смесях для трансфекции, в частности, о комбинации T366K:L351K/L351D':L368E' (далее обозначаемая как КК/DE или DEКК), проводили более детальные эксперименты по соотношению.

Ранее использованные VH-области антител с известной способностью образовывать пары с общей легкой цепью IGKV1-39 использовали для повторного клонирования в конструкции 1, 2, 68 и 69, с получением векторов I-V табл. 17. Векторы I-V, каждый из которых содержал последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие общую легкую цепь человека, а также тяжелую цепь Ig с отличающейся СНЗ-областью и отличающейся антигенной специфичностью, впоследствии трансфицировали в клетки с различными соотношениями при трансфекции, как указано в табл. 18. Результаты представлены на фиг. 23.

Таблица 17

Вектор	Ген VH	Антигенная специфичность	Масса VH (Да)	Обозначение Merus	Клонирован в конструкцию #
I	IGHV 3.30	Фибриноген (А)	12794	MF1122	69 (L351D, L368E)
II	IGHV 3.23	RSV (С)	13941	MF2729	69 (L351D, L368E)
III	IGHV 1.08	Столбняк (В)	13703	MF1337	68 (T366K, L351K)
IV	IGHV 3.30	Фибриноген (А)	12794	MF1122	1 (E356K, D399K)
V	IGHV 1.08	Столбняк (В)	13703	MF1337	2 (K392D, K409D)

Таблица 18

Номер трансфекции	векторы	соотношение
1	I и III	5:1
2	I и III	3:1
3	I и III	1:1
4	I и III	1:3
5	I и III	1:5
6	II и III	5:1
7	II и III	3:1*
8	II и III	1:1
9	II и III	1:3
10	II и III	1:5
11	IV и V	5:1
12	IV и V	3:1
13	IV и V	1:1
14	IV и V	1:3
15	IV и V	1:5

* Вследствие технической ошибки измерение для этого образца не проводили.

На фиг. 23А и 23В показано, что для комбинации мутаций DEКК, когда присутствует избыток А или С (А или С находятся на "DE-стороне" и В находится на "КК-стороне"), образуется АВ или ВС, однако присутствует избыток А или С в качестве смеси обоих гомодимеров и половинных молекул во всех случаях. Однако, когда присутствует избыток В (В находится на "КК-стороне" и А или С находятся на "DE-стороне"), существует отчетливое отличие. АВ или ВС все еще образуются, однако избыток В по существу отсутствует в качестве гомодимера, и образуются только половинные молекулы. Проценты вновь измеряли по высоте пика. Следует отметить, что пики, обнаруженные в диапазоне 2% или менее,

находятся ниже порога точного измерения с помощью используемой технологии nMS. Таким образом, результаты измерений <2% считаются находящимися в пределах уровня шума анализа и, таким образом, игнорируются. Неожиданно, избыток В приводит к высоким процентам только половинной молекулы В. Особенно высокие проценты половинной молекулы В наблюдали при соотношениях 1:3 и 1:5 А:В (фиг. 23А и 23В) в отсутствие гомодимера ВВ, что указывает на то, что мутации СНЗ на КК-стороне являются неблагоприятными для гомодимеризации. Отсутствие гомодимеров обеспечивает ключевое преимущество, поскольку эта "КК-сторона" комбинации DEKK может быть выбрана так, чтобы она включала специфичность, которая может иметь известные неблагоприятные эффекты, когда она присутствует в качестве гомодимера (например, известно, что антитела против сМЕТ или CD3 имеют нежелательные побочные эффекты, когда они присутствуют в терапевтических композициях в качестве двухвалентных гомодимеров).

Выявленные данные для различных соотношений DE:KK являются противоположными контрольным мутациям СНЗ с обращением заряда в векторах IV и V. На фиг. 23С показано, что для комбинации мутаций E356K:D399K/K392D':K409D', когда присутствует избыток А (А находится на "стороне K392D:K409D"), избыток А присутствует в качестве смеси обоих гомодимеров и половинных молекул во всех случаях, но также когда присутствует избыток В (В находится на "E356K:D399K-стороне"), избыток В присутствует в качестве смеси обоих гомодимеров и половинных антител во всех случаях. Даже при более высоких соотношениях 1:3 и 1:5 не наблюдают половинных молекул В, хотя гомодимеры присутствуют, что указывает на то, что сторона E356K:D399K не является настолько же неблагоприятной для гомодимеризации, как и КК-сторона комбинации DEKK.

В совокупности комбинация мутаций DEKK обеспечивает очевидную пользу относительно мутаций СНЗ с обращением заряда, поскольку одна из цепей гетеродимера не образует гомодимеров.

Пример 22. Разновидности смесей с использованием комбинации DEKK.

Поскольку было продемонстрировано, что комбинация мутаций DEKK обеспечивает образование биспецифических IgG-молекул ("АВ") с высокой чистотой, авторы настоящего изобретения далее исследовали осуществимость контролируемого получения более комплексных смесей антител из одной клетки, таких как смеси "АВ и АА" или "АВ и АС". Ранее использованные модельные Fab включали в векторы, которые содержат либо "конструкцию DE", либо "конструкцию КК" и различные комбинации этих векторов коэкспрессировали с получением смесей, чтобы продемонстрировать универсальность технологии. Модельные Fab MF1337 (столбнячный токсин), MF1122 (фибриноген) и MF1025 (тиреоглобулин) были выбраны, исходя из их общего стабильного поведения, высоких уровней экспрессии и отличий масс между IgG, содержащими эти Fab (см. табл. 19).

Таблица 19

Специфичность	Название Fab	Масса IgG	Δ-масса MF1122
Столбняк (А)	(MF) *1337	146747,03	+1842,05
Фибриноген (В)	(MF) 1122	144904,98	0
Тиреоглобулин (С)	(MF) 1025	144259,87	-645,11

* MF=Fab Merus, оба обозначения, такие как MF1337 и 1337, используют взаимозаменяемо.

Таблица 20

Схема трансфекции

Транс- фекция #	Тяжелая цепь 1	Тяжелая цепь 2	Тяжелая цепь 3	Соотношение трансфекции	Ожидаемые типы (%)	Наблюдаемые типы (%)
1	1337-КК	1122-DE	1025-DE	2:1:1	АВ (50%) АС (50%)	АВ (43%) АС (57%)
2	1337-DE	1122-КК	1025-КК	2:1:1	АВ (50%) АС (50%)	АВ (40%) АС (54%) АА (6%)
3	1337-КК	1122-DE	1025-КК	1:2:1	АВ (50%) ВС (50%)	АВ (54%) ВС (46%)
4	1337-КК	1122-КК	1025-DE	1:1:2	АС (50%) ВС (50%)	АС (66%) ВС (33%) СС (1%)
5	1337-КК	1337-DE	1122-DE	2:1:1	АА (50%) АВ (50%)	АА (57%) АВ (43%)
6	1337-КК	1122-КК	1122-DE	1:1:2	АВ (50%) ВВ (50%)	АВ (75%) ВВ (25%)

7	1337-КК	1337-DE	1025-DE	2:1:1	AA (50%) AC (50%)	AA (46%) AC (54%)
8	1337-КК	1025-КК	1025-DE	1:1:2	AC (50%) CC (50%)	AC (60%) CC (40%)
9	1337-КК	1122-DE		1:1	AB (100%)	AB (>98%)
10	1337-КК	1025-DE		1:1	AC (100%)	AC (>98%)
11	1122-КК	1025-DE		1:1	BC (100%)	AC (>98%)

Анализ SDS-PAGE продемонстрировал, что большинство образцов в основном состояло из IgG и в некоторых случаях присутствовали половинные молекулы в небольших процентных соотношениях. Более того, многие из образцов продемонстрировали две полосы на уровне приблизительно 150 кДа на невосстанавливающих гелях, что отражает присутствие двух различных типов IgG в образце. Также на восстанавливающих гелях в некоторых образцах были видны две полосы тяжелых цепей (данные не представлены).

Нативную MS проводили для всех образцов и проценты выявленных типов вычисляли, исходя из высоты пика (% наблюдаемых типов в табл. 20). Результаты представлены на фиг. 24. Во всех восьми образцах, где коэкспрессировались три тяжелых цепи, наблюдали два основных пика, которые соответствовали ожидаемым типам. В двух из этих образцов (трансфекции 2 и 4) и в случае трансфекции 11 наблюдали небольшое количество примесей гомодимера DE-DE. Половинные молекулы были выявлены в очень небольших количествах в большинстве образцов (менее 2%), что не является проблематичным, поскольку они могут быть без труда отделены от фракции полноразмерных IgG, как описано ранее. После nMS было обнаружено, что выявленная масса IgG в образце 11 соответствовала типу, отличающемуся от ожидаемого, и было сделано заключение, что это является следствием ошибки при трансфекции, т.е. в образце 11, по-видимому, 1025-DE был котрансфицирован с 1337-КК вместо 1122-КК.

Образцы IgG далее исследовали в сэндвич-ELISA для подтверждения функционального присутствия желаемой специфичности. Покрытие планшетов для ELISA проводили с помощью фибриногена или тиреоглобулина и обнаружение проводили с помощью меченого флуоресцеином тиреоглобулина или столбнячного токсоида. Антигены для обнаружения были мечены флуоресцеином (набор Pierce NHS-fluorescein Antibody Labeling kit, каталожный № #53029) в соответствии с инструкциями изготовителя. Затем меченные флуоресцеином антигены можно было впоследствии обнаруживать с помощью конъюгированного с FITC антитела против флуоресцеина (Roche diagnostics, каталожный № #11426346910).

Результаты ELISA для биспецифических молекул (величины OD450) обобщенно представлены в табл. 21. В выделенных серым цветом ячейках указаны ожидаемые типы для каждой трансфекции. Как правило, результаты удовлетворяют ожидаемому исходу, с учетом исключений, указанных курсивом или полужирным шрифтом. При трансфекциях 1-3, предполагаемая "отрицательная" лунка для типов BC (трансфекция #1 и 2) или AC (трансфекция 3) продемонстрировала значительный фоновый сигнал. Из предшествующих исследований известно, что ELISA для биспецифических молекул может иметь недостаток в виде высоких фоновых уровней. Эти фоновые уровни также могут быть вызваны потенциальным присутствием половинных молекул в образце. Следует отметить, что результаты биспецифического ELISA действительно подтвердили, что произошла ошибка при трансфекции #11, поскольку был обнаружен тип AC (величина, выделенная полужирным шрифтом) вместо BC.

Таблица 21

Величины OD450 для биспецифического ELISA

Трансфекция #	Обнаруженные типы IgG		
	AB (столбняк-фибриноген)	AC (столбняк-тиреоглобулин)	BC (фибриноген-тиреоглобулин)
1	0.989	1.792	<i>0.438</i>
2	1.085	1.852	<i>0.418</i>
3	1.419	<i>0.775</i>	1.547
4	0.205	1.795	1.22
5	1.367	0.047	0.057
6	1.359	0.043	0.06
7	0.054	1.779	0.054
8	0.04	1.338	0.052
9	1.588	0.048	0.051
10	0.044	1.805	0.055
11	0.043	1.821	0.056

Пример 23. Усовершенствованные смеси двух биспецифических антител, распознающих 4 различных эпитопа (AB и CD), из одной клетки.

В примере 12 было предположено, что смеси вследствие трансфекций ZA или ZB, как ожидается, будут проблематичными при переходе на крупномасштабную продукцию, поскольку описано, что варианты типа "выступ-в-полости" являются нестабильными и нельзя исключить, что СНЗ-домены, содержащие "выступ" или "полость" будут димеризоваться с СНЗ-доменами с модифицированными способами инженерии зарядом. Как было продемонстрировано в указанных выше примерах, было выявлено, что новые мутанты с зарядовой парой предпочтительно обеспечивают гетеродимеризацию практически без образования гомодимеров, содержащие СНЗ-домен полипептидные цепи, содержащие эти новые мутанты с зарядовыми парами, могут экспрессироваться в клетках вместе с ранее известными содержащими СНЗ-домен полипептидными цепями с модифицированными способами инженерии зарядом или потенциально с молекулами SEED, и, вероятно, это приведет к преимущественному образованию только двух биспецифических молекул.

Из описанных выше примеров, понятно, что комбинация мутаций DEKK является превосходной для продуцирования одной биспецифической молекулы (AB) или двух биспецифических молекул (AB плюс AC) клональными клетками, где димеризация тяжелых цепей запускается СНЗ-доменами. Однако, использование только одного набора векторов для комплементарных мутаций СНЗ ограничивает количество возможностей для разновидностей смесей, которые могут быть получены. Было бы возможно получить более комплексные смеси IgG и/или биспецифических молекул, таких как смеси "AB и CD" или "AB и CC", если бы второй "независимый" набор векторов можно было использовать в комбинации с DEKK. При комбинировании двух наборов векторов, важным требованием является то, чтобы тяжелые цепи, экспрессированные с двух различных наборов векторов для модифицированных способами инженерии СНЗ, не могли формировать "перекрестные" димеры, что представляет собой случай, когда тяжелые цепи, продуцированные одним из наборов векторов, димеризуются в полный IgG с тяжелыми цепями, экспрессированными другим набором векторов.

Для исследования такого потенциального образования "перекрестных" димеров проводили анализ *in silico* с использованием HADDOCK для получения дополнительной информации о том, произойдет ли возможное образование пары между СНЗ-доменами дикого типа и СНЗ-доменами, содержащими DE- или KK-мутации. Аналогично анализировали потенциальное образование пар между СНЗ-доменами дикого типа и СНЗ-доменами, содержащими мутации E356K, D399K или K392D, K409D, а также потенциальное образование пар между СНЗ-доменами дикого типа и СНЗ-доменами, содержащими мутации типа "выступ-в-полости" и любую комбинацию из вышеуказанных. Комбинации мутантов СНЗ, которые анализировали в HADDOCK, приведены в табл. 22, и полученные показатели HADDOCK обобщенно представлены на фиг. 25.

Таблица 22

Варианты СНЗ, проанализированные в HADDOCK с однобуквенными кодами, присвоенными для каждой содержащей вариант СНЗ тяжелой цепи

Комбинация СНЗ	Мутации	Однобуквенный код в HADDOCK
DEKK	Цепь 1: T366K, L351K	A
	Цепь 2: L351D, L368E	B
Дикий тип (WT)	Цепь 1: нет	C*
	Цепь 2: нет	D*
Обращение заряда (CR)	Цепь 1: K392D, K409D	A/C**
	Цепь 2: E356K, D399K	B/D**
"выступ-в-полости" (КИН)	Цепь 1: T366W	C
	Цепь 2: T366S, L368A, Y407V	D

* Цепи дикого типа обозначают как "C" и "D" для систематичности.

** Варианты с обращением заряда обозначают как "A и B", когда они находятся в комбинации с вариантами типа "выступ-в-полости", и их обозначают "C и D", когда они находится в комбинации с вариантами DE/KK.

На фиг. 25 показано, что, исходя из этих прогнозов HADDOCK, комбинирование комбинаций DEKK СНЗ с комбинациями СНЗ с обращением заряда, наиболее вероятно, будет успешным с точки зрения образования желаемой комбинации двух биспецифических молекул (AB и CD) без примесей побочных продуктов (особенно AC, AD, BC, BD) при котрансфекции в одной клетке. Как можно видеть из фиг. 25, эти нежелательные биспецифические типы AC, AD, BC и BD имеют относительно высокие показатели HADDOCK, в то время как желаемые типы AB и CD имеют наиболее низкие показатели

HADDOCK. Безусловно, когда любая из комбинаций СНЗ DEKK или с обращением заряда будет помещена в конструкцию, обладающую той же специфичностью (например "С" на DE-стороне, "С" на КК-стороне, "А" на E356K,D399K-стороне и "В" на E356K,D399K-стороне, или "А" на DE-стороне, "В" на КК-стороне, "С" на E356K,D399K-стороне и "С" на E356K,D399K-стороне), это приведет к продукции в основном СС и АВ при коэкспрессии в клетке.

Напротив, при рассмотрении прогнозов для коэкспрессии DEKK с диким типом можно видеть, что показатели HADDOCK для АС и АД являются более низкими, чем показатель HADDOCK для CD, что указывает на то, что АС и АД являются очень вероятными примесями при попытке получить смесь АВ и CD путем коэкспрессии векторов, кодирующих комбинации СНЗ DEKK, вместе с векторами, кодирующими СНЗ дикого типа. Наконец, прогнозы для коэкспрессии либо DEKK, либо вариантов с обращением заряда вместе с вариантами типа "выступ-в-полости" дают нежелательные биспецифические варианты с относительно низкими показателями HADDOCK, т.е. высокой вероятностью того, что эти нежелательные типы будут продуцироваться при коэкспрессии.

Таким образом, было сделано заключение, что комбинирование комбинаций СНЗ DEKK с комбинациями СНЗ с обращением заряда (E356K,D399K/K392'D,K409D') идеально подходит для получения по существу чистых смесей антител "АВ и CD" и/или "АВ и СС".

Далее получали смеси 2 биспецифических молекул, распознающих 4 мишени/эпитопа (АВ и CD), и смеси одного биспецифического и 1 моноспецифического антитела, распознающих 3 мишени/эпитопа (АВ и СС), применяя вышеописанное на практике. Эти смеси создавали с использованием 4 различных VH, все из которых способны образовывать пару с общей легкой цепью IGVK1-39, однако все индивидуальные комбинации VH/VL обладают отличающейся специфичностью. Для проведения анализа с помощью нативной MS различие масс между (ожидаемыми) типами должно быть достаточным, т.е. >190 Да. Было выбрано четырех индивидуальных VH и их массы были такими, чтобы ожидаемые типы при котрансфекции можно было идентифицировать и разделить с помощью nMS. Более того, различия масс между 4 выбранными VH также являются достаточно большими, чтобы идентифицировать большинство возможных примесей в смесях, в дополнение к двум желаемым типам. Выбранные VH приведены в табл. 23.

Таблица 23

VH (мишень)	Масса как в IgG wt
A (RTK1)	146736,78
B (столбнячный токсин)	146106,20
C (Фибриноген)	144904,98
D (RTK2)	145421,37

Четыре различных VH клонировали в векторы, содержащие конструкции "DE" или "KK" или конструкции с обращением заряда, и проводили несколько котрансфекций, как указано в табл. 24. Примечание: как всегда, все векторы также содержали нуклеиновую кислоту, кодирующую общую легкую цепь IGKV1-39. Как описано ранее, при комбинировании двух наборов векторов важным требованием является то, что тяжелые цепи, экспрессированные с двух различных наборов сконструированных векторов с СНЗ, не могут образовывать "перекрестные" димеры, что означает, что тяжелые цепи, продуцированные одним из наборов векторов, димеризуются в полноразмерный IgG с тяжелыми цепями, экспрессируемыми другим набором векторов. Для исследования такого потенциального образования "перекрестных" димеров между тяжелыми цепями, содержащими мутации с обращением заряда, и тяжелыми цепями, содержащими мутации DE или KK, проводили контрольные трансфекции.

Таблица 24

Трансфекция #	1-ая		Ожидаемые типы		
	VH/конструкция #	2-ая VH/конструкция #			
1	D/68	A/68	несоответствие "KK" и "KK"; ожидаются по большей части половинные молекулы		
2	D/68	A/69	соответствие "KK" и "DE"; ожидается продукт AD		
3	D/68	A/1	Ожидается несоответствие "KK" и "E356K:D399K"		
4	D/68	A/2	Ожидается несоответствие "KK" и "K392D:K409D"		
5	D/69	A/68	соответствие "DE" и "KK"; ожидается продукт AD		
6	D/69	A/69	несоответствие "DE" и "DE"; ожидается смесь половинных молекул, AA, AD и DD		
7	D/69	A/1	Ожидается несоответствие "DE" и "E356K:D399K"		
8	D/69	A/2	Ожидается несоответствие "DE" и "K392D:K409D"		
Трансфекция #	1-ая		3-я		Ожидаемые типы
	VH/конструкция #	2-ая VH/конструкция #	VH/конструкция #	4-ая VH/конструкция #	
9	A/68	B/69	C/1	D/2	AB и CD
10	A/68	A/69	C/1	D/2	AA и CD
11	A/68	B/69	C/1	C/2	AB и CC

В табл. 25 предоставлен дополнительный обзор масс ожидаемых типов и возможные примеси при трансфекциях #9-11 табл. 24.

Таблица 25

Трансфекция # 9		
Тип*	Масса	Отличие масс
C	72464,62	
D	72684,53	219,90
B	73070,99	386,47
A	73410,46	339,47
CC	144929,2	71518,78
CD	145149,2	219,90
DD	145369,1	219,90
BC	145535,6	166,56
BD	145755,5	219,90
AC	145875,1	119,57
AD	146095	219,90
BB	146142	47,00
AB	146481,5	339,47
AA	146820,9	339,47
Трансфекция # 10		
Тип	Масса	Отличие масс
C	72464,62	
D	72684,53	219,90
A	73410,46	725,94
CC	144929,2	71518,78
CD	145149,2	219,90
DD	145369,1	219,90
AC	145875,1	506,03
AD	146095	219,90
AA	146820,9	725,94

Трансфекция # 11		
Тип	Масса	Отличие масс
С	72464,62	
В	73070,99	606,37
А	73410,46	339,47
СС	144890,95	71480,49
ВС	145535,61	644,66
АС	145875,08	339,47
ВВ	146141,98	266,90
АВ	146481,45	339,47
АА	146820,92	339,47

Для каждой из трансфекций #9-11 типы отсортированы по массе, отличие масс вычислено с помощью масс, указанных выше.

Серые ячейки: ожидаемые (и желательные) типы.

Курсив: отличие масс является слишком малым, чтобы осуществить разделение в анализе nMS.

* Типы: единичные буквы соответствуют половинным молекулам; двухбуквенный код указывает на целый IgG.

Все очищенные образцы белков, полученные после трансфекций.

#1-11 анализировали на SDS-PAGE, и было включено три контрольных образца (фиг. 26). Кроме того, анализ nMS проводили на образцах белка после трансфекций # 9-11 для идентификации всех типов в образцах. Как можно видеть из фиг. 26, трансфекции #3 и #4 приводили к ожидаемому несоответствию между конструкциями "КК" и либо "E356K:D399K", либо "K392D:K409D", и количество половинных молекул в образцах белков после этих трансфекций превышало количество полноразмерных молекул IgG. Трансфекции #7 и #8 привели к образцам белков, где как половинные молекулы, так и полный IgG присутствуют приблизительно в равных количествах. Однако из SDS-PAGE нельзя установить, соответствует ли полный IgG димеру DE/DE, димеру DE/E356K:D399K или димеру DE/K392D:K409D. Примечательно, что практически не наблюдали половинных молекул в образцах после трансфекций #9-11.

На фиг. 27 представлен анализ nMS для трансфекций #9 и #11. Проценты ожидаемых типов и являющихся примесями типов вычисляли по высоте пика. Было продемонстрировано, что для трансфекции #9, ожидаемые типы "АВ и CD" соответствуют 97% смеси (30% АВ и 67% CD), в то время как присутствовало только приблизительно 3% примесей BD (фиг. 27А). Для трансфекции # 11 ожидаемые типы "АВ и СС" соответствуют 94% смеси (33% АВ и 61% СС), в то время как присутствует только приблизительно 6% примесей ВС (4,1%) и АС (1,8%) (фиг. 27В). Эти данные демонстрируют, что действительно возможно получить более комплексные смеси IgG и/или биспецифических молекул, такие как смеси "АВ и CD" или "АВ и СС", когда второй "независимый" набор векторов используют в комбинации с DEKK. Комбинация конструкций с обращенным зарядом с конструкциями DEKK приводит к только очень ограниченному образованию "перекрестных" димеров. Ожидается, что путем корректирования соотношений трансфекции низкие проценты этих примесей побочных продуктов могут быть снижены еще далее.

Пример 24. Исследование фармакокинетики с однократной дозой у мышей.

Для исследования фармакокинетического (pK) поведения биспецифических антител, содержащих комбинацию мутаций DEKK в их областях CH3, в этом исследовании определяли и сравнивали параметры pK для трех различных партий IgG.

Три партии IgG включали

1) родительское антитело дикого типа против столбнячного токсоида 1337:1337 (два Fab MF1337 на остоле Fc дикого типа);

2) родительское антитело против столбнячного токсоида 1516:1516 (два MF1516 Fab на Fc-остове дикого типа);

3) биспецифическое антитело против столбнячного токсоида с модифицированными способами инженерии CH3 1516:1337, которое содержит комбинацию мутаций DEKK в Fc-области (MF1516 Fab на DE-стороне, MF1337 Fab на KK-стороне).

Родительские антитела 1337:1337 и 1516:1516 были выбраны в качестве специфичностей для включения в биспецифический продукт с DEKK, поскольку было известно, что исходя из предшествующих исследований в нескольких штаммах мышей отсутствовал ответ в сыворотке до введения дозы. Примечание: присутствие ответа сыворотки до введения дозы, безусловно, делает исследование недействительным. Кроме того, существует достаточное отличие масс между родительскими антителами, чтобы обеспечить идентификацию типов 1337:1337 (wt Fc), 1516:1337 (DEKK Fc) и 1516:1516 (wt Fc) с помощью nMS. Три партии IgG получали, как описано ранее, однако ДНК, используемую для трансфекции, получали с использованием набора Endo-free maxiprep kit, чтобы гарантировать, что количество эндоток-

синов является максимально низким. Затем партии исследовали в отношении концентрации белков, уровней агрегатов, уровней эндотоксинов и процента биспецифического продукта. Было продемонстрировано, что критерии соответствия для последующего применения партий IgG в исследовании рК удовлетворялись, т.е. концентрация IgG после гель-фильтрации составляла >0,3 мг/мл, уровни агрегатов составляли <5%, уровни эндотоксинов составляли <3 EU/мг белка и партия DEKK содержала >90% биспецифического IgG.

Нативная масс-спектрометрия образцов после гель-фильтрации продемонстрировала, что ожидаемые типы присутствовали на высоких процентах. В образце 1516:1337 обнаружено небольшое количество гомодимера DE:DE, которое, согласно оценке, составляет приблизительно 2% (фиг. 28). Было сделано заключение, что 3 партии IgG подходят для использования в исследовании рК.

Для сравнения параметров рК между тремя партиями 3 группам самок мышей C57BL/6J (Harlan, Нидерланды) вводили 1 мг/кг IgG человека (5 мл/кг раствор иммуноглобулина/кг массы тела). В момент введения возраст животных составлял 7-8 недель, и они имели массу тела приблизительно 18-20 г. Образцы крови собирали до введения дозы и через 15, 60 мин и 2, 4, 8, 24, 48, 96, 168, 268 и 336 ч после дозирования. Образцы сыворотки получали и хранили при <-20°C до анализа. Каждая группа состояла из 3 подгрупп по 4 мыши, т.е. 12 мышей/группа. Проводили взятие образцов от каждой мыши в 6 моментов времени. Жизнеобеспечение животных осуществляли в соответствии с общими принципами, регулирующими использование животных в экспериментах European Communities (директива 86/609/ЕЕС) и Dutch legislation (The Experiments on Animals Act, 1997). Это исследование также проводили в соответствии со Standards for Humane Care and Use of Laboratory Animals, от Office of Laboratory Animal Welfare, U.S. National Institutes of Health, под идентификационным номером 45859-01 (дата истечения срока: 30 апреля 2015 г.).

Мышам группы 1 вводили полноразмерное моноспецифическое IgG-антитело 1516:1516 (треугольники); мышам в группе 2 вводили полноразмерное моноспецифическое IgG-антитело 1337:1337 (квадраты); мышам в группе 3 вводили полноразмерное биспецифическое IgG-антитело 1516:1337 (ромбы) с модифицированными способами инженерии DEKK областями CH3 (1516 на DE-стороне и 1337 на KK-стороне).

Анализ ELISA использовали для количественного анализа моноклональных антител человека в сыворотке мыши с использованием количественного ELISA для IgG человека (ZeptoMetrix, NY USA; набор ELISA № 0801182). В кратком изложении, анализ ELISA основан на принципе, что моноклональное антитело человека связывается с IgG против антител человека, нанесенным на 96-луночный планшет для ELISA. Затем связавшееся антитело визуализируют с использованием поликлонального IgG-антитела против антител человека, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP). Оптическая плотность каждой лунки прямо пропорциональна количеству антитела в образце сыворотки. Результаты представлены на фиг. 29, и было выявлено, что сывороточные уровни как биспецифического полноразмерного IgG-антитела, содержащего комбинацию мутаций DEKK, так и его родительских моноспецифических антител, являются поразительно сходными. Было сделано заключение, что мутации CH3, присутствующие в биспецифическом антителе DEKK, не изменяют ни стабильности, ни времени полужизни, и вариант DEKK имеет такое же поведение, как и IgG дикого типа.

Ссылки

- Deisenhofer J., *Biochemistry* 1981(20)2361-2370;
 Miller S., *J. Mol. Biol.* 1990(216)965-973;
 Padlan, *Advances in Protein Chemistry* 1996 (49) 57-133
 Ellerson JR., et al., *J. Immunol* 1976 (116) 510-517;
 Lee and Richards *J. Mol. Biol.* 1971(55)379.
 Gunasekaran et al *J.Biol.Chem.* 2010(285)19637-19646
 De Vries *Nature Protocols* 2010(5)883
 Kabat et al, (1991)

- Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach (M. Butler, ed., IRL Press, 1991)
- Merchant Nature biotechnology 1998(16)677
- Ridgeway Protein Engineering 1996(9)617-621.
- Davis JH. Et al., Protein Engineering, Design & Selection 2010(23)195-202
- Papadea and Check. Crit Rev Clin Lab Sci. 1989;27(1):27-58.
- Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Paterson, editors (1973)
- Ionescu et al., J. Pharm. Sci. 2008 (97)1414)
- Current protocols in Protein Science 1995, coligan JE et al., Wingfield PT, ISBN 0-471-11184-8, Bendig 1988.
- Capelle, M.A.H., Brugger, P., Arvinte, T. **Vaccine** 23 (2005), 1686-1694.
- Demeule, B., Lawrence, M.J., Drake, A.F., Gurny, R., Arvinte, T. Biochim. Biophys. Acta 1774 (2007a), 146-153.
- Demeule, B., Gurny, R., Arvinte, T., Int. J. Pharm 329 (2007b), 37-45.
- Lakowicz, J.R., Principles of fluorescence spectroscopy; Second Edition Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, (2006) ISBN 0-306-46093-9.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения гетеродимерного антитела с помощью клетки-хозяина, где указанное антитело содержит два СНЗ-домена, которые способны образовывать поверхность контакта, причем указанный способ включает

i) введение первой нуклеиновой кислоты, кодирующей первую содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь, и второй нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь, в клетку-хозяина, где указанная первая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит положительно заряженный аминокислотный остаток в аминокислотном положении 366 согласно системе нумерации EU и указанная вторая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит отрицательно заряженный аминокислотный остаток в аминокислотном положении 351 согласно системе нумерации EU;

ii) культивирование указанной клетки-хозяина и обеспечение экспрессии указанных двух нуклеиновых кислот; и

iii) сбор указанного гетеродимерного антитела из культуры.

2. Способ получения гетеродимерного антитела с помощью клетки-хозяина, где указанное антитело содержит два СНЗ-домена, которые способны образовывать поверхность контакта, причем указанный способ включает

i) введение первой нуклеиновой кислоты, кодирующей первую содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь, и второй нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую содержащую СНЗ-домен полипептидную цепь, в клетку-хозяина, где указанная первая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит отрицательно заряженный аминокислотный остаток в аминокислотном положении 366 согласно системе нумерации EU и указанная вторая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит положительно заряженный аминокислотный остаток в аминокислотном положении 351 согласно системе нумерации EU;

ii) культивирование указанной клетки-хозяина и обеспечение экспрессии указанных двух нуклеиновых кислот; и

iii) сбор указанного гетеродимерного антитела из культуры.

3. Способ по п.1 или 2, дополнительно включающий предоставление клетке-хозяину указанной нуклеиновой кислоты, кодирующей общую легкую цепь, которая способна образовывать пару по меньшей мере с двумя различными тяжелыми цепями.

4. Способ по п.1 или 3, где указанная первая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит остаток лизина (K) в аминокислотном положении 366 согласно системе нумерации EU и указанная вто-

рая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит остаток аспарагиновой кислоты (D) в аминокислотном положении 351 согласно системе нумерации EU.

5. Способ по п.4, где указанная первая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь дополнительно содержит остаток лизина (K) в аминокислотном положении 351 согласно системе нумерации EU.

6. Способ по п.4 или 5, где указанная вторая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь дополнительно содержит остаток глутаминовой кислоты (E) или остаток аспарагиновой кислоты (D) в аминокислотном положении 349 согласно системе нумерации EU и/или остаток глутаминовой кислоты (E) в аминокислотном положении 368 согласно системе нумерации EU.

7. Способ по п.6, где указанная вторая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь дополнительно содержит остаток глутаминовой кислоты (E) в аминокислотном положении 368 согласно системе нумерации EU.

8. Способ по любому из пп.1-7, в котором наличие загрязняющих гомодимеров в культуре клеток-хозяев составляет менее 5%.

9. Способ по любому из пп.1-8, в котором наличие загрязняющих гомодимеров в культуре клеток-хозяев составляет менее 2%.

10. Способ по любому из пп.1-9, в котором наличие загрязняющих гомодимеров в культуре клеток-хозяев составляет менее 1%.

11. Способ по любому из пп.1-10, в котором загрязняющие гомодимеры по существу отсутствуют в культуре клеток-хозяев.

12. Способ по любому из пп.1-11, в котором каждая кодируемая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь дополнительно содержит вариабельную область, распознающую эпитоп.

13. Способ по п.12, где две вариабельные области содержащих СНЗ-домен полипептидных цепей распознают различные эпитопы.

14. Способ по п.13, в котором различные эпитопы расположены на одной и той же мишени.

15. Способ по п.14, в котором мишень является растворимой.

16. Способ по п.14, в котором мишень является мембраносвязанной.

17. Способ по п.13, в котором различные эпитопы расположены на различных мишенях.

18. Способ по п.17, в котором различные мишени экспрессированы на одной и той же клетке.

19. Способ по п.17, в котором различные мишени экспрессированы на разных клетках.

20. Способ по п.17, в котором различные мишени являются растворимыми.

21. Способ по п.17, где одна мишень является растворимой, а вторая является мембраносвязанной.

22. Способ по любому из пп.12-14, 16-19 или 21, где по меньшей мере один из указанных эпитопов расположен на опухолевой клетке.

23. Способ по любому из пп.12-14, 16-19 или 21, где по меньшей мере один из указанных эпитопов расположен на эффекторной клетке.

24. Способ по п.23, где указанная эффекторная клетка представляет собой NK-клетку, Т-клетку, В-клетку, моноцит, макрофаг, дендритную клетку или нейтрофильный гранулоцит.

25. Способ по п.23 или 24, где указанный эпитоп расположен на молекуле CD3, CD16, CD25, CD28, CD64, CD89, NKG2D или NKp46.

26. Способ по любому из пп.1-25, в котором указанное гетеродимерное антитело представляет собой IgG человека.

27. Способ по любому из пп.1-26, в котором гетеродимерное антитело представляет собой IgG1 человека.

28. Способ по любому из пп.3-27, в котором указанная общая легкая цепь является зародышевой легкой цепью.

29. Способ по любому из пп.3-28, в котором указанная общая легкая цепь представляет собой перестроенную зародышевую легкую цепь каппа IgVkl-39*01/IGJk1*01 человека.

30. Гетеродимерное антитело для противоопухолевой терапии, полученное способами по любому из пп.1-29.

31. Гетеродимерное антитело для терапии инфекционного заболевания, полученное способами по любому из пп.1-29.

32. Гетеродимерное антитело по п.30 или 31, где указанное гетеродимерное антитело связывается с различными эпитопами на том же антигене и/или на различных эпитопах на различных антигенах.

33. Гетеродимерное антитело для противоопухолевой терапии, где указанное антитело содержит два СНЗ-домена, которые способны образовывать поверхность контакта, где указанный первый СНЗ-домен содержит положительно заряженный аминокислотный остаток в аминокислотном положении 366 согласно системе нумерации EU и указанный второй СНЗ-домен содержит отрицательно заряженный аминокислотный остаток в аминокислотном положении 351 согласно системе нумерации EU.

34. Гетеродимерное антитело для терапии инфекционного заболевания, где указанное антитело содержит два СНЗ-домена, которые способны образовывать поверхность контакта, где указанный первый СНЗ-домен содержит положительно заряженный аминокислотный остаток в аминокислотном положении 366 согласно системе нумерации EU и указанный второй СНЗ-домен содержит отрицательно заря-

женный аминокислотный остаток в аминокислотном положении 351 согласно системе нумерации EU.

35. Гетеродимерное антитело для противоопухолевой терапии, где указанное антитело содержит два СНЗ-домена, которые способны образовывать поверхность контакта, где указанный первый СНЗ-домен содержит отрицательно заряженный аминокислотный остаток в аминокислотном положении 366 согласно системе нумерации EU и указанный второй СНЗ-домен содержит положительно заряженный аминокислотный остаток в аминокислотном положении 351 согласно системе нумерации EU.

36. Гетеродимерное антитело для терапии инфекционного заболевания, где указанное антитело содержит два СНЗ-домена, которые способны образовывать поверхность контакта, где указанный первый СНЗ-домен содержит отрицательно заряженный аминокислотный остаток в аминокислотном положении 366 согласно системе нумерации EU и указанный второй СНЗ-домен содержит положительно заряженный аминокислотный остаток в аминокислотном положении 351 согласно системе нумерации EU.

37. Гетеродимерное антитело для противоопухолевой терапии, полученное способом по любому из пп.1 или 3-29, содержащее два СНЗ-домена, в котором одно из указанных двух СНЗ-доменов содержит остаток аспарагиновой кислоты (D) в аминокислотном положении 351 согласно системе нумерации EU и остаток глутаминовой кислоты (E) в аминокислотном положении 368 согласно системе нумерации EU и в котором другие указанные два СНЗ-домена содержат лизин (K) в аминокислотном положении 366 согласно системе нумерации EU и лизин (K) в аминокислотном положении 351 согласно системе нумерации EU.

38. Гетеродимерное антитело для терапии инфекционного заболевания, полученное способом по любому из пп.1 или 3-29, содержащее два СНЗ-домена, в котором одно из указанных двух СНЗ-доменов содержит остаток аспарагиновой кислоты (D) в аминокислотном положении 351 согласно системе нумерации EU и остаток глутаминовой кислоты (E) в аминокислотном положении 368 согласно системе нумерации EU и в котором другие указанные два СНЗ-домена содержат лизин (K) в аминокислотном положении 366 согласно системе нумерации EU и лизин (K) в аминокислотном положении 351 согласно системе нумерации EU.

39. Гетеродимерное антитело для противоопухолевой терапии, содержащее два СНЗ-домена, в котором одно из указанных двух СНЗ-доменов содержит остаток аспарагиновой кислоты (D) в аминокислотном положении 351 согласно системе нумерации EU и остаток глутаминовой кислоты (E) в аминокислотном положении 368 согласно системе нумерации EU и в котором другие указанные два СНЗ-домена содержат лизин (K) в аминокислотном положении 366 согласно системе нумерации EU и лизин (K) в аминокислотном положении 351 согласно системе нумерации EU.

40. Гетеродимерное антитело для терапии инфекционного заболевания, содержащее два СНЗ-домена, в котором одно из указанных двух СНЗ-доменов содержит остаток аспарагиновой кислоты (D) в аминокислотном положении 351 согласно системе нумерации EU и остаток глутаминовой кислоты (E) в аминокислотном положении 368 согласно системе нумерации EU и в котором другие указанные два СНЗ-домена содержат лизин (K) в аминокислотном положении 366 согласно системе нумерации EU и лизин (K) в аминокислотном положении 351 согласно системе нумерации EU.

41. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих первую и вторую полипептидные цепи, содержащие СНЗ-домены антитела, полученного способом по любому из пп.1 или 3-29, где указанная первая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит положительно заряженный аминокислотный остаток в аминокислотном положении 366 согласно системе нумерации EU и где указанная вторая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит отрицательно заряженный аминокислотный остаток в аминокислотном положении 351 согласно системе нумерации EU.

42. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих первую и вторую полипептидные цепи, содержащие СНЗ-домены антитела, полученного способом по любому из пп.2-29, где указанная первая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит отрицательно заряженный аминокислотный остаток в аминокислотном положении 366 согласно системе нумерации EU и где указанная вторая содержащая СНЗ-домен полипептидная цепь содержит положительно заряженный аминокислотный остаток в аминокислотном положении 351 согласно системе нумерации EU.

43. Рекомбинантная клетка-хозяин по п.41 или 42, где указанная клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую общую легкую цепь, которая способна образовывать пару по меньшей мере с двумя различными тяжелыми цепями.

44. Фармацевтическая композиция, предназначенная для противоопухолевой терапии или терапии инфекционного заболевания, содержащая гетеродимерное антитело по любому из пп.30-40 и фармацевтически приемлемый носитель.

45. Фармацевтическая композиция по п.44, в которой указанное гетеродимерное антитело получено с помощью рекомбинантных клеток-хозяев по любому из пп.41-43.

46. Способ получения клетки-хозяина по п.41 или 43 для продукции гетеродимерного антитела, причем способ включает стадию введения в указанную клетку-хозяина одной или более нуклеиновых кислот, кодирующих по меньшей мере первую и вторую содержащие СНЗ-домен полипептидные цепи,

аминокислотная последовательность Fc IgG дикого типа, присутствующая
в сконструированном векторе MV1057 (с использованием схемы нумерации EU)

131 141 151 161 171 181
SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS

191 201 211 221 231 241
SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT

251 261 271 281 291 301
LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH

311 321 331 341 351 361
QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTIKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK

371 381 391 401 411 421
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVEFSCSVMHE

431 441
ALHNHYTQKS LSLSPGK

Фиг. 2

нуклеотидные и аминокислотные последовательности использованных VH-областей

MF1025_VH

gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcttggtacagcctggggggtccctgagactctcctgtgcag
cctctggattccaccttagcagctatgccatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtg
ggtctcagctatagtggtagtggtggtagcacatactacgcagactccgtgaagggccggttcaccatc
tccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacaagggcctgt
attactgtgcaagggccgattggtggcgacttttgactactggggccaaggtaccctggtcacc

MF1025_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARADWWATFDYWGQGLVT

MF1122_VH

gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggctccctgagactctcctgtgcag
cctctggattccacctcagtagctatggcatgcactgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtg
ggtggcagttatcatatgatggaagtaataaatactatgcagactccgtgaagggccgattcaccatc
tccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagctgaggacacggccgtgt
attactgtgcaagagccctcttcaagaccatcgccatggactattggggccaaggtaccctggtcacc

MF1122_VH

EVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARALFTTIAMDYWGQGLVT

MF1337 VH

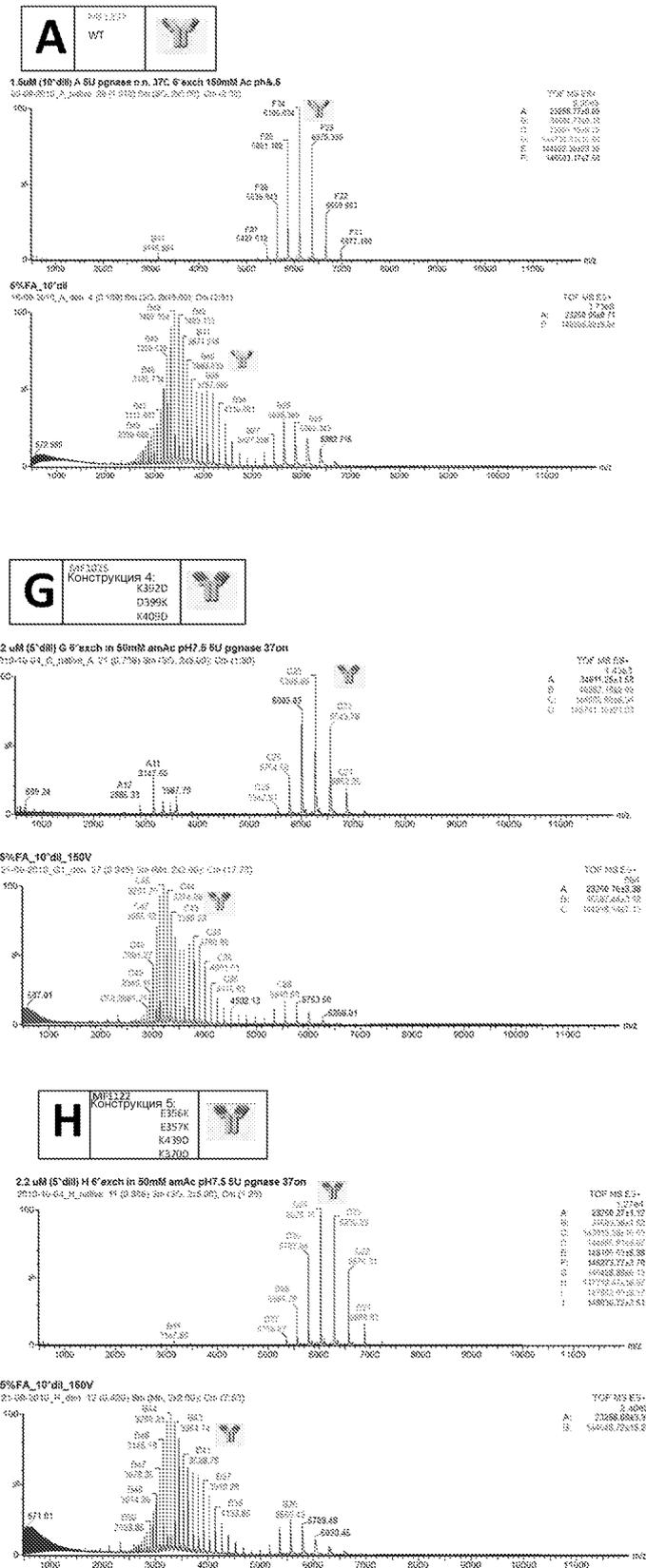
gaggtgcagctggtggagactggggctgaggtgaagaagccgggggctcagtgaggctctcctgcaaggcttct
gactacatcttcccaaatatgacatcaactgggtgcgccaggccctggacaagggcttgaatggatggatgg
atgagcgtaacactggaacacgggctatgcacagaagttccagggcagagtcaccatgaccagggacacgtcc
ataaacacagcctacatggagctgagcagcctgacatctggtgacacggccggttatttctgtgagaggtagt
cttttcaagacagagacggcgccctactatcacttcgctctggagctctggggccaagggaccacggctcacc

MF1337

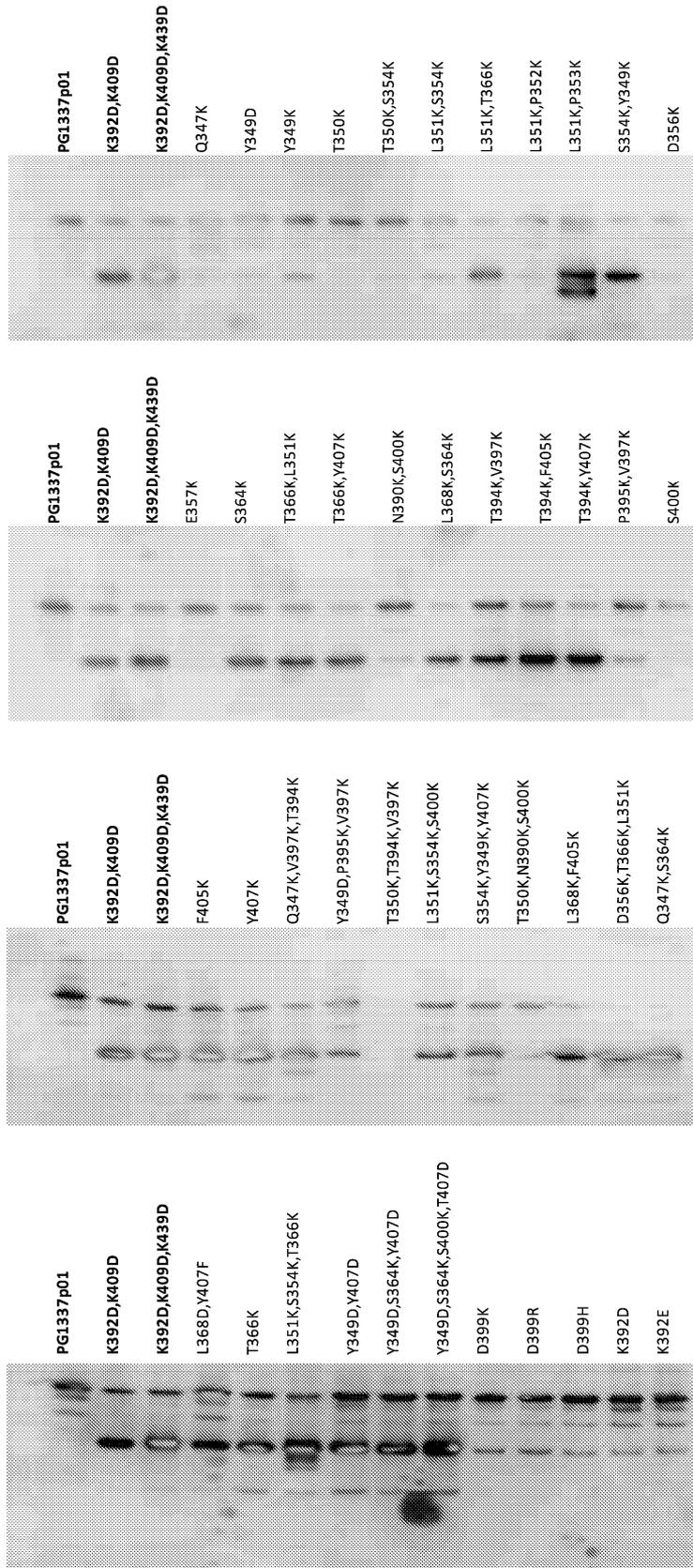
VHEVQLVETGAEVKKPGASVKVSKASDYIFTKYDINWVRQAPGQGLEWVGWMSANTGNTGYAQKFQGRVIMTRD
TSINTAYMELSSLTSGDTAVYFCARSSLFKTETAPYYHFALDVWGQGLT

Фиг. 3

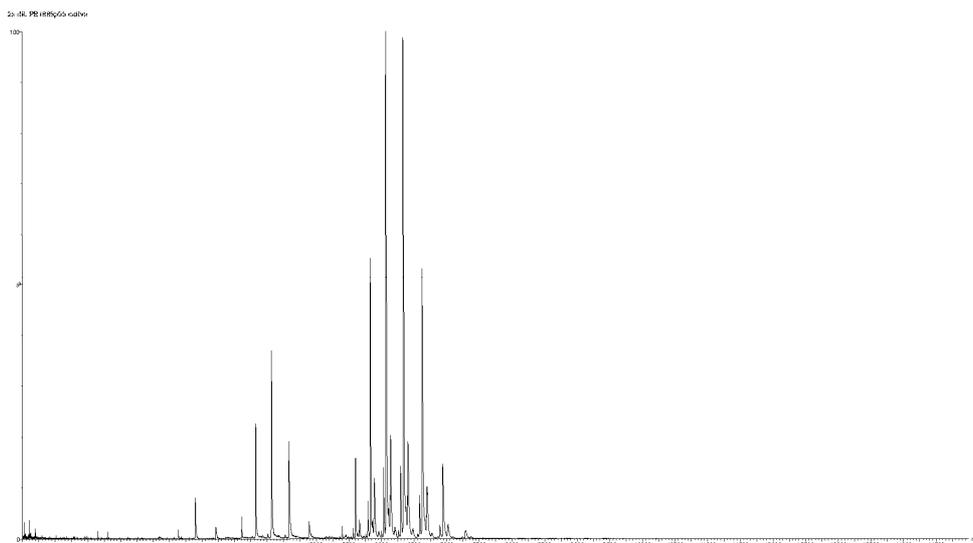
Данные масс-спектрометрии для трансфекций А, G и H



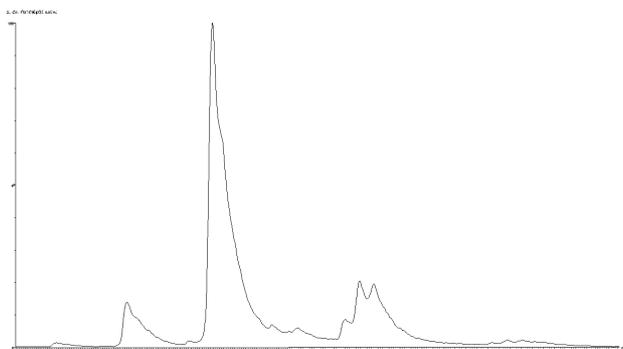
Фиг. 4



Фиг. 7

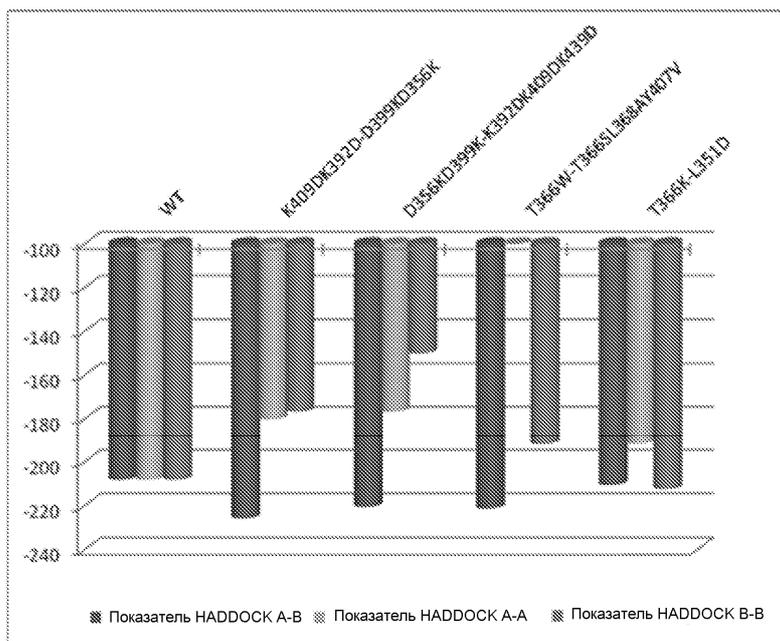


А) Спектр нативной MS для образца для трансфекции ZO (T366K/L351'D)

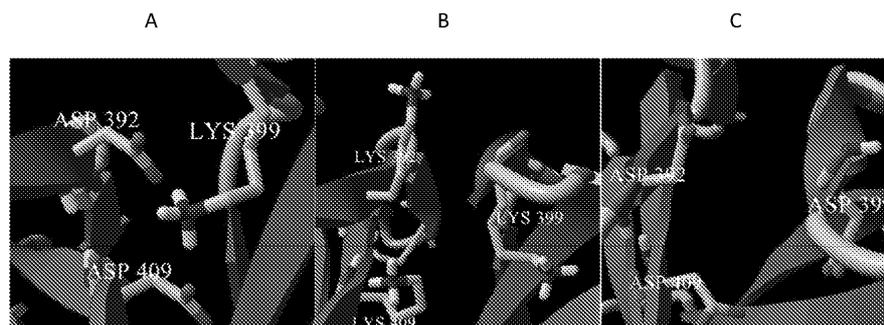


В) Свернутый спектр MS для образца для трансфекции ZO (T366K/L351'D).
Второй/главный пик соответствует биспецифической молекуле.

Фиг. 8

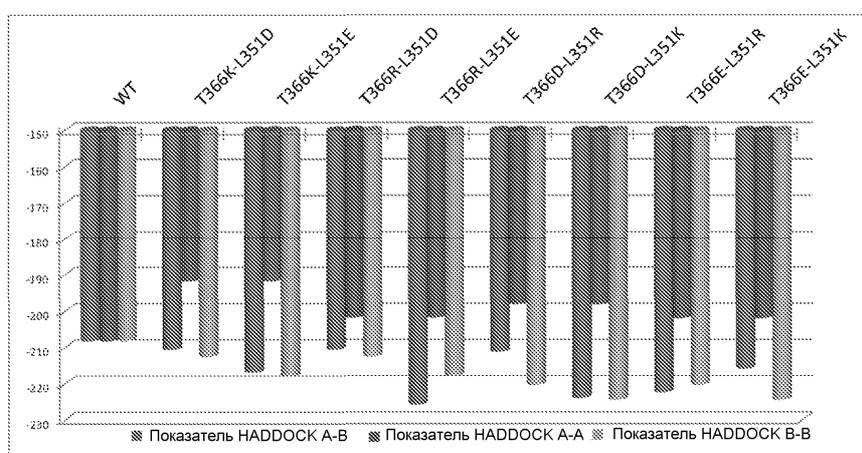


Фиг. 9

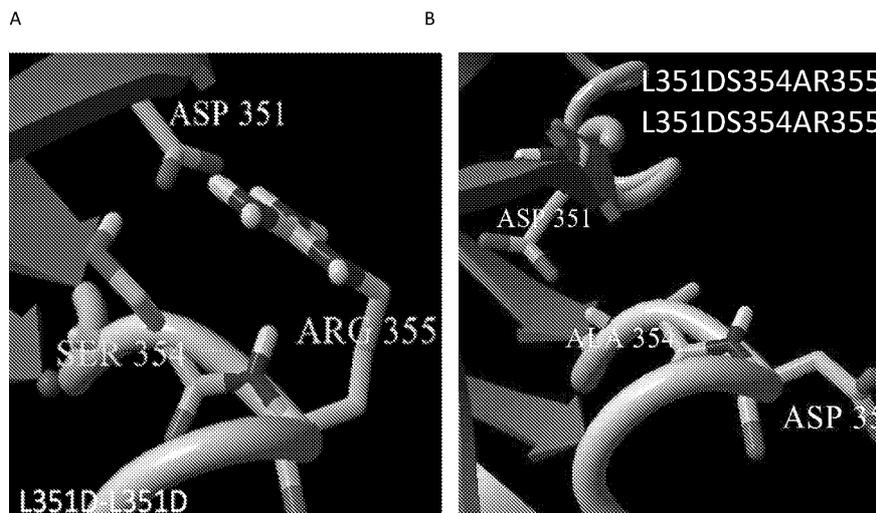


- A K409D:K392D/D399'K:E356'K
- B D399K:E356K/D399'K:E356'K
- C K409D:K392D/K409'D:K392'D

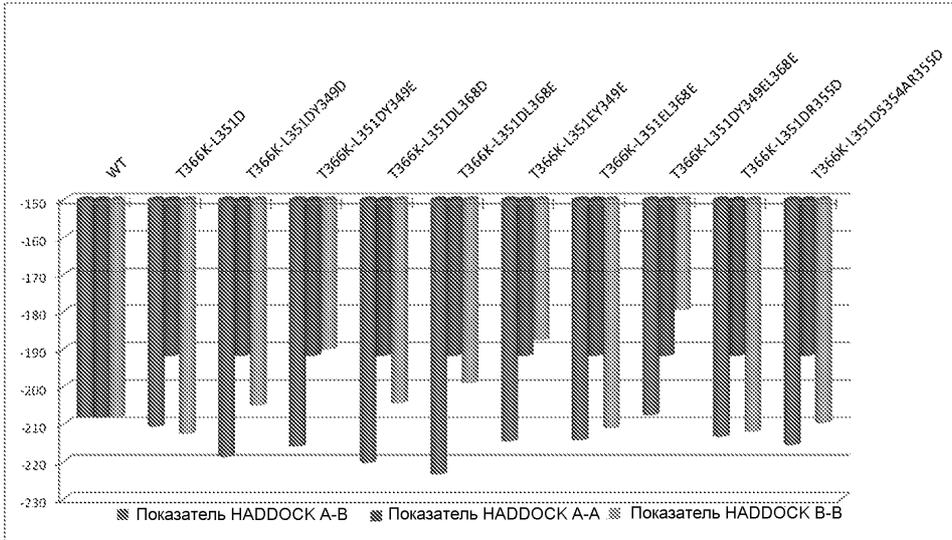
Фиг. 10



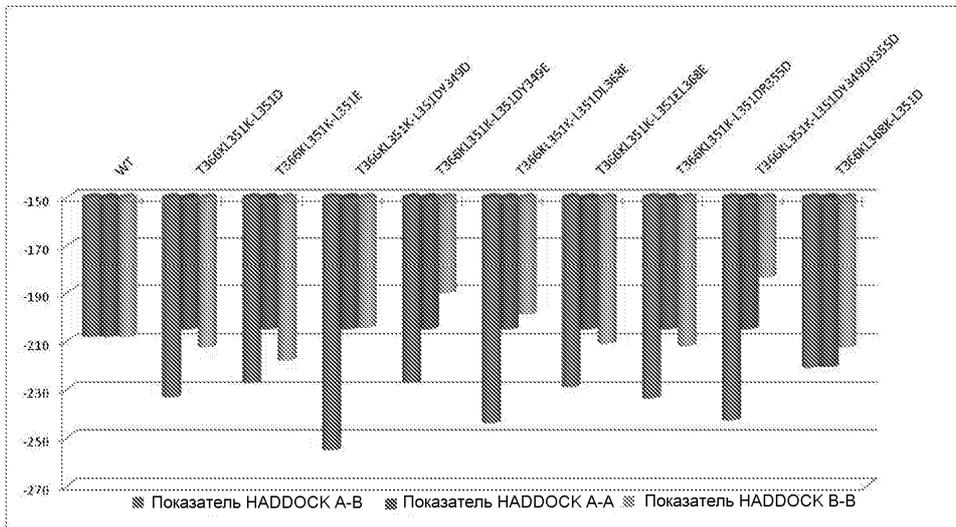
Фиг. 11



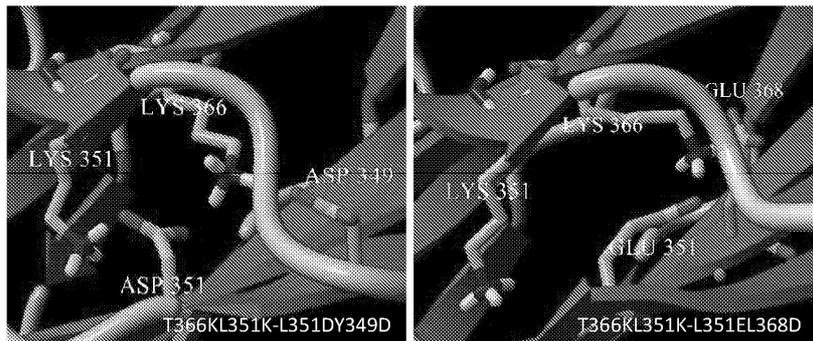
Фиг. 12



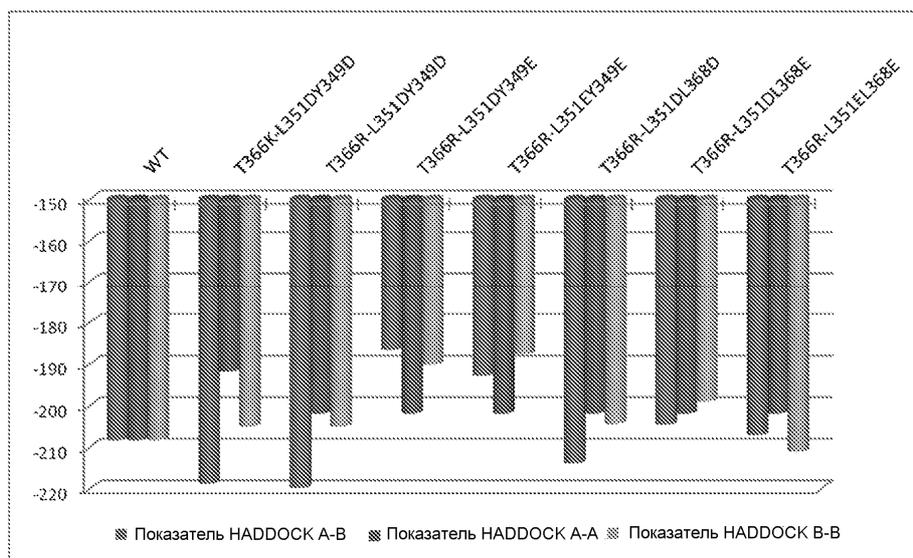
Фиг. 13



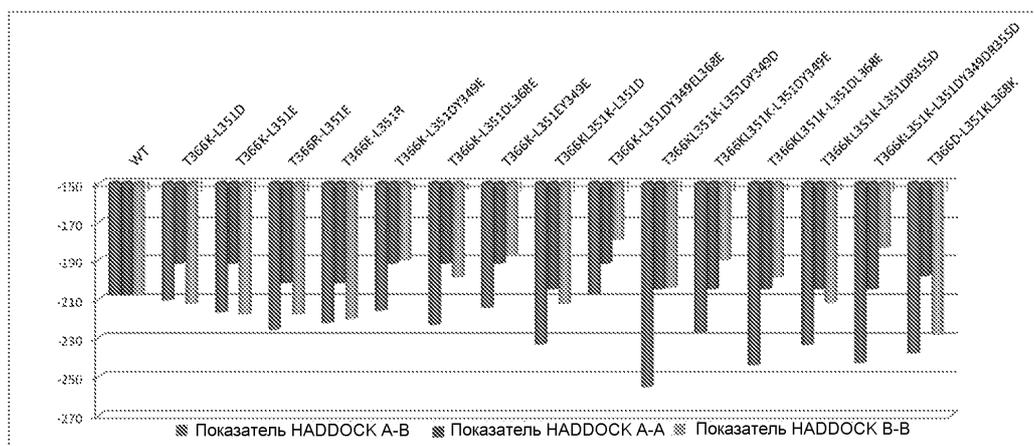
Фиг. 14



Фиг. 15

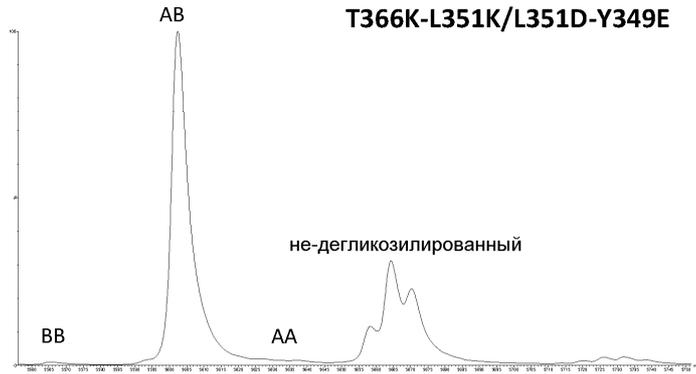
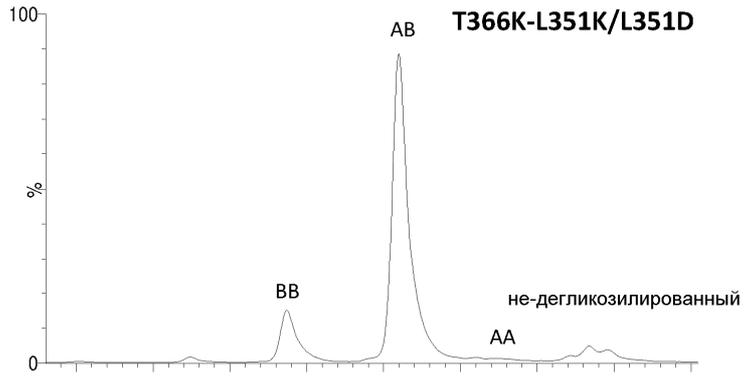


Фиг. 16

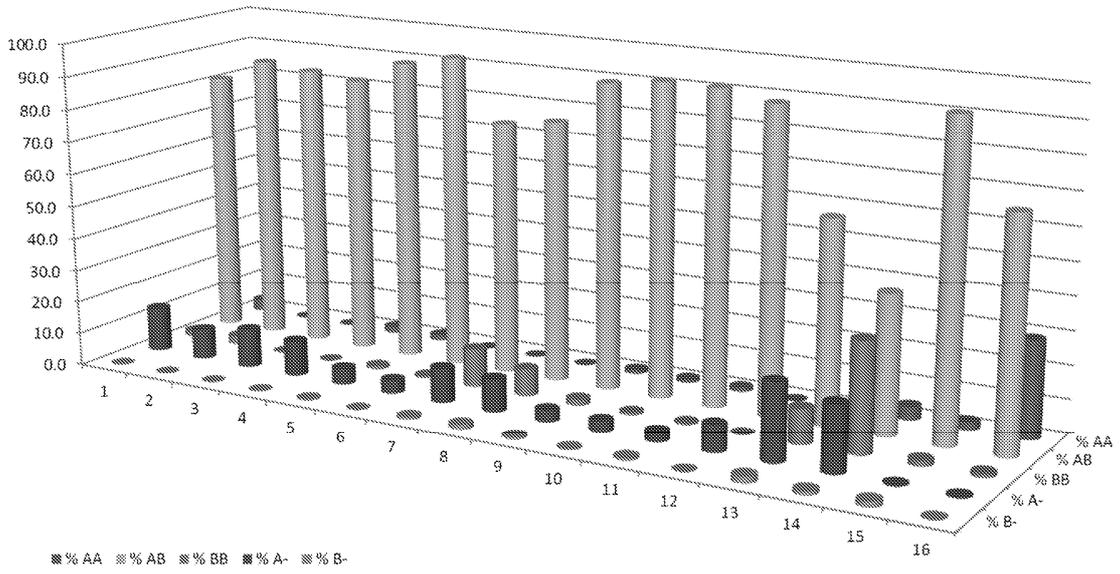


Фиг. 17

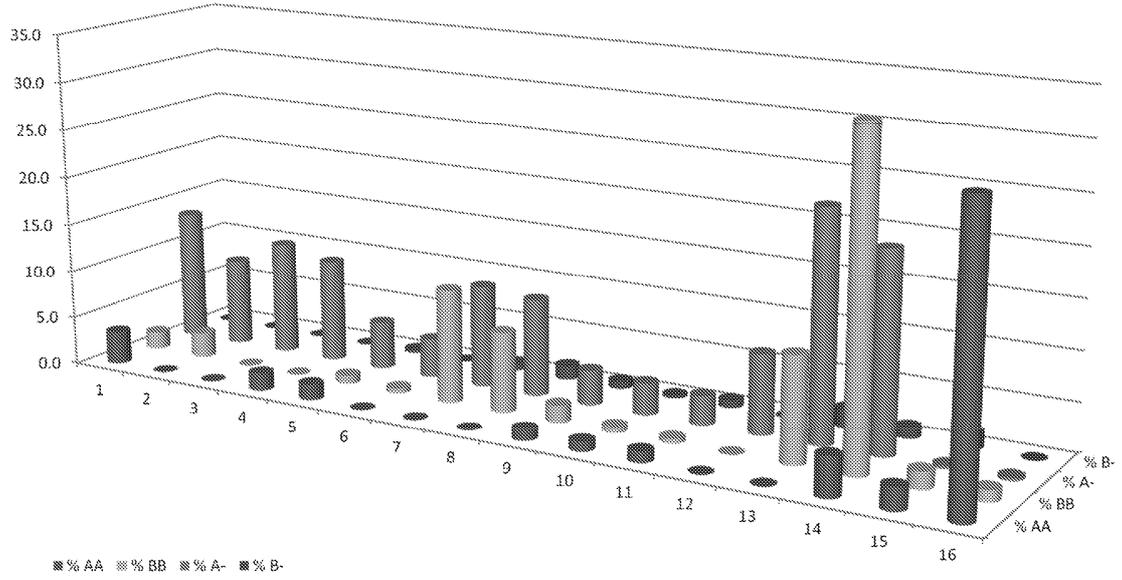
046272



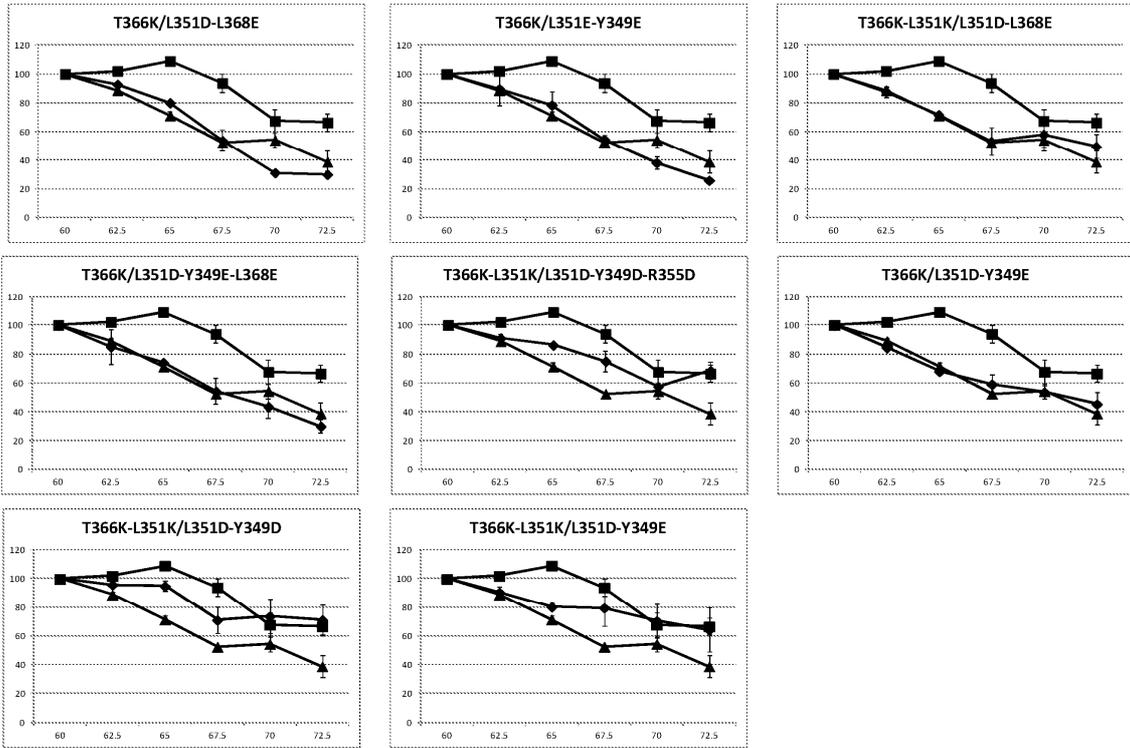
Фиг. 18



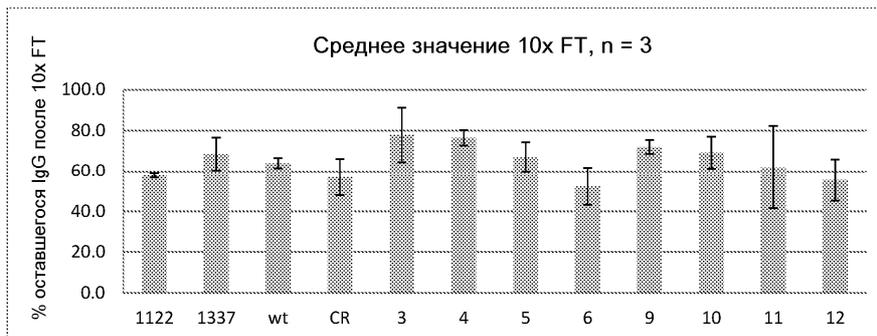
Фиг. 19А



Фиг. 19В

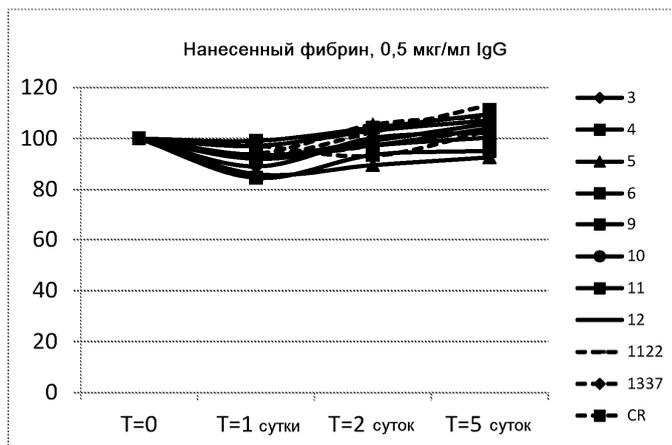


Фиг. 20

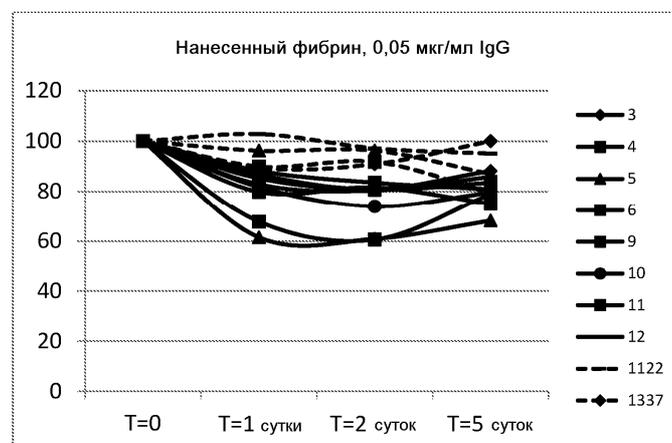


Фиг. 21

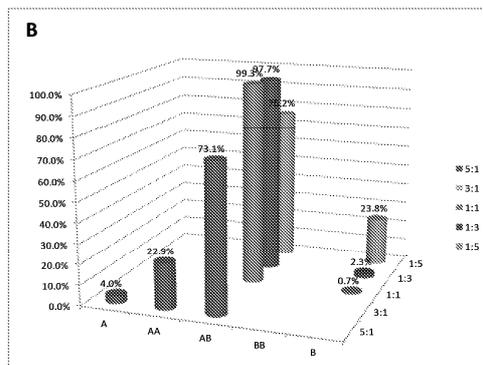
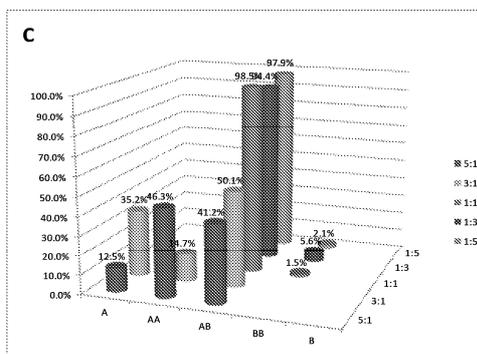
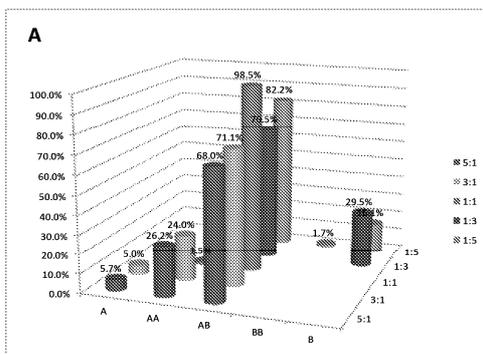
A



B



Фиг. 22

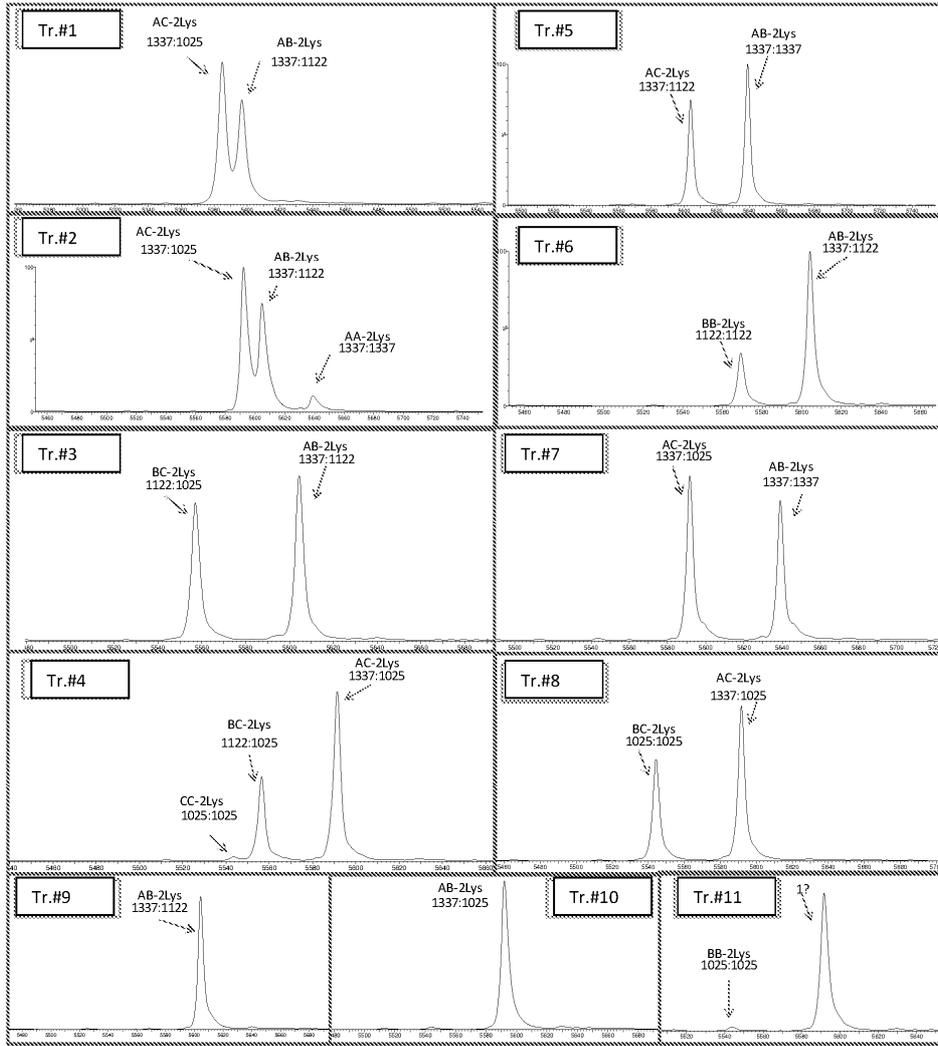


A	5:1	3:1	1:1	1:3	1:5
A	5.7%	5.0%			
AA	26.2%	24.0%	1.5%		
AB	68.0%	71.1%	98.5%	70.5%	82.2%
BB				29.5%	16.1%
B					1.7%

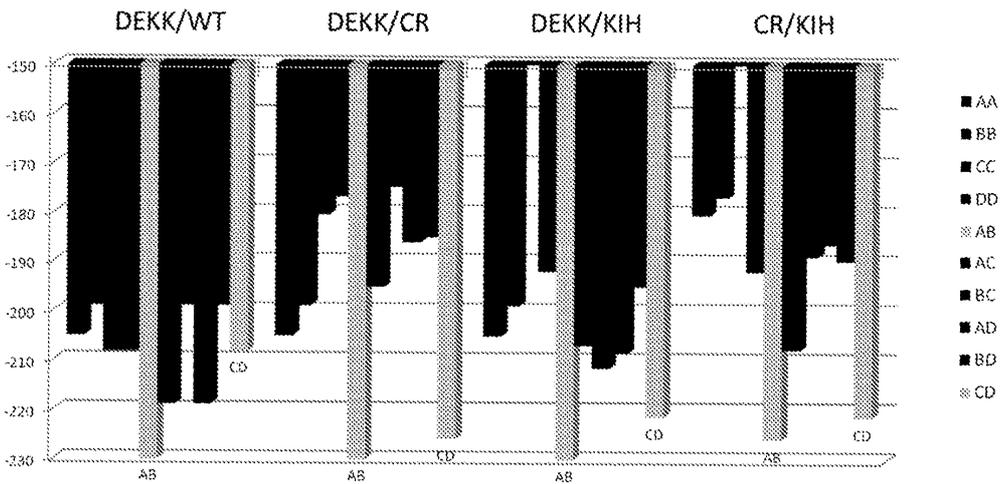
B	5:1	3:1	1:1	1:3	1:5
A	4.0%				
AA	22.9%				
AB	73.1%	99.3%	97.7%	76.2%	
BB			0.7%	2.3%	23.8%

C	5:1	3:1	1:1	1:3	1:5
A	12.5%	35.2%			
AA	46.3%	14.7%			
AB	41.2%	50.1%	98.5%	94.4%	97.9%
BB			1.5%	5.6%	2.1%
B					

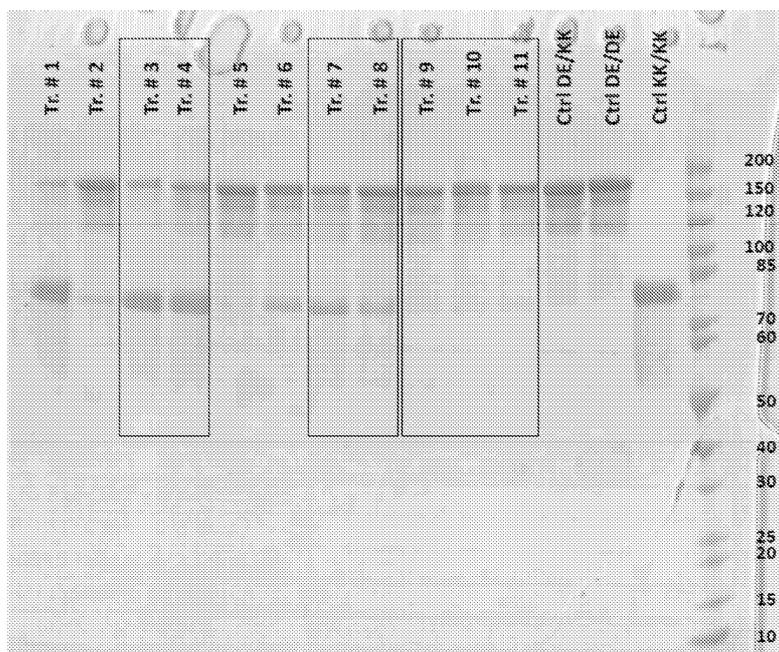
Фиг. 23



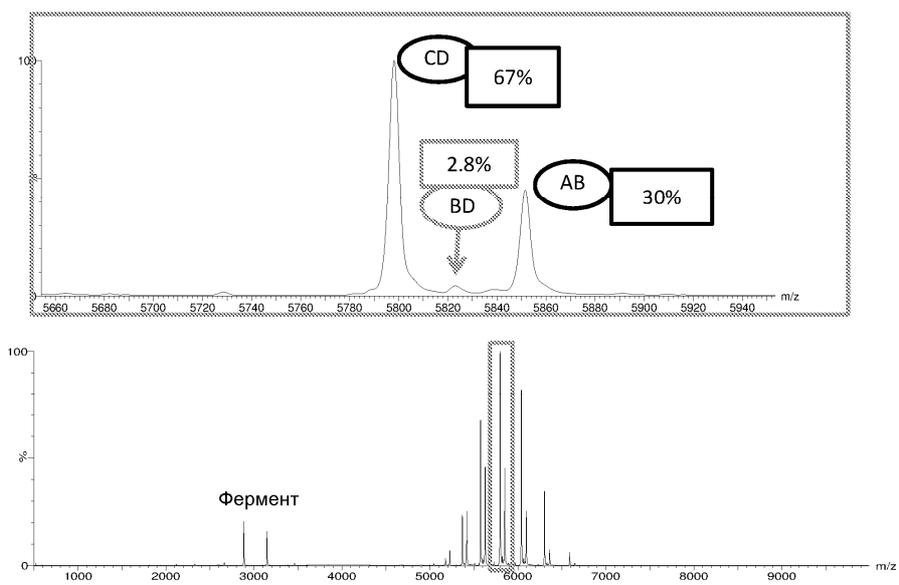
Фиг. 24



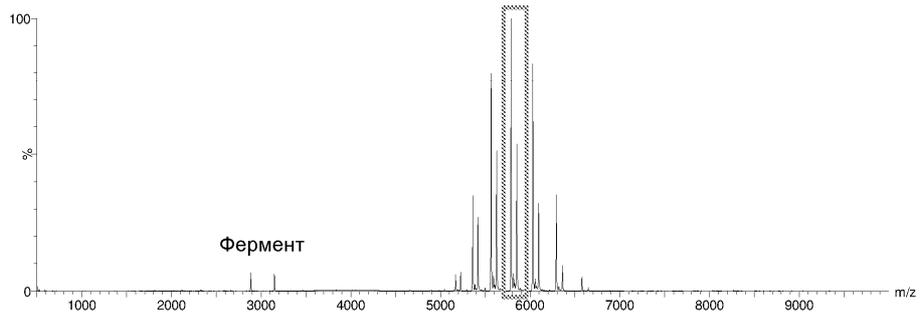
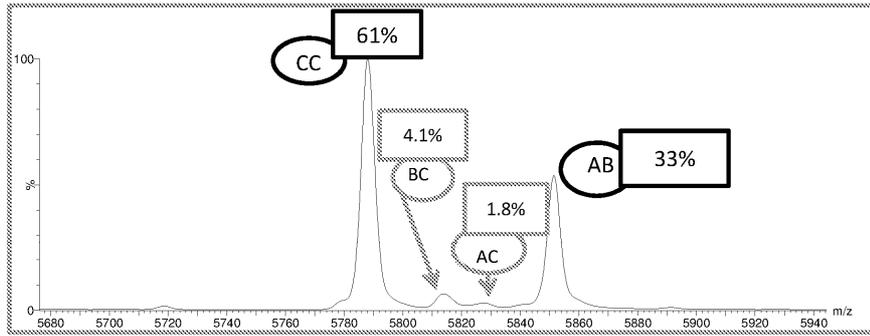
Фиг. 25



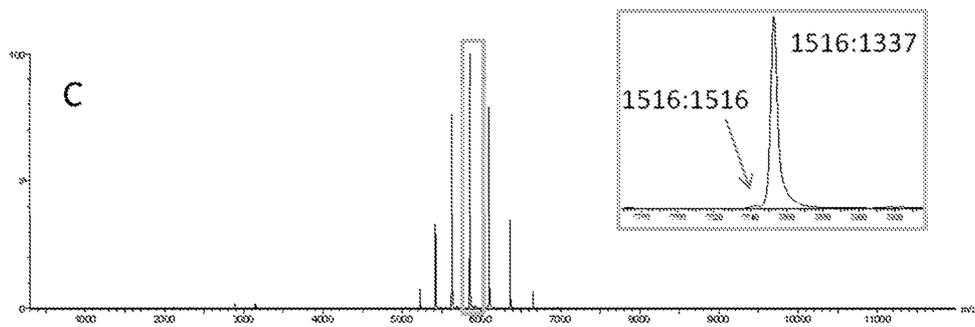
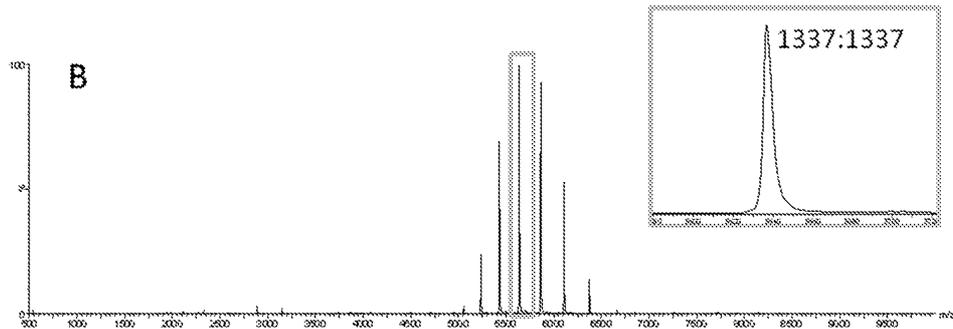
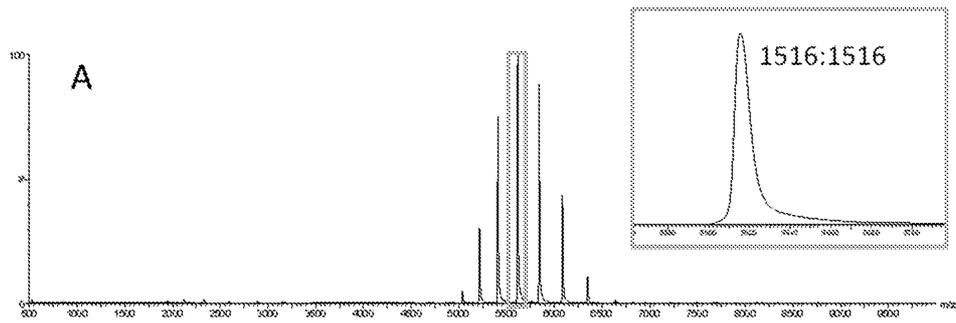
Фиг. 26



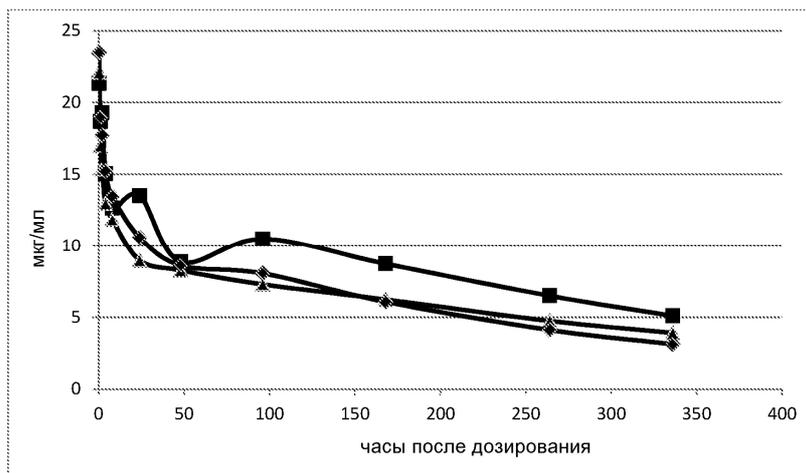
Фиг. 27А



Фиг. 27В



Фиг. 28



Фиг. 29

