

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046654**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.04.04

(21) Номер заявки
201892010

(22) Дата подачи заявки
2017.04.20

(51) Int. Cl. **C07K 16/00** (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИТЕЛ, ОСНОВАННЫЕ НА ПРИМЕНЕНИИ ЛОКУСОВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ПОВЫШЕННУЮ ЭКСПРЕССИЮ**

(31) **62/325,400**

(32) **2016.04.20**

(33) **US**

(43) **2019.03.29**

(86) **PCT/US2017/028555**

(87) **WO 2017/184832 2017.10.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Бабб Роберт, Бураков Дарья, Чен Ганг,
Фандл Джеймс П., Чжао Ю (US)**

(74) Представитель:
**Угрюмов В.М., Глухарёва А.О.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В. (RU)**

(56) WO-A1-2008151219
WO-A1-2014121087
WO-A1-2013190032
WO-A1-2010141478
CHRISTINE LATTENMAYER ET AL:
"Identification of transgene integration loci of
different highly expressing recombinant CHO
cell lines by FISH", CYTOTECHNOLOGY, KLUWER
ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 51, no. 3,
15 November 2006 (2006-11-15), pages 171-182,
XP019448503, ISSN: 1573-0778, DOI: 10.1007/
S10616-006-9029-0

LIN ZHANG ET AL: "Recombinase-mediated
cassette exchange (RMCE) for monoclonal antibody
expression in the commercially relevant CHOK1SV
cell line", BIOTECHNOLOGY PROGRESS., vol.
31, no. 6, 13 October 2015 (2015-10-13), pages
1645-1656, XP055383248, US ISSN: 8756-7938,
DOI: 10.1002/btpr.2175

SOEREN TURAN ET AL: "Recombinase-
mediated cassette exchange (RMCE) - A
rapidly-expanding toolbox for targeted genomic
modifications", GENE., vol. 515, no. 1, 1 February
2013 (2013-02-01), pages 1-27, XP055383251, NL
ISSN: 0378-1119, DOI: 10.1016/j.gene.2012.11.016
WO-A1-2016064999

(57) Настоящее изобретение относится к сайт-специфической интеграции и экспрессии рекомбинантных белков в эукариотических клетках. В частности, настоящее изобретение включает композиции и способы для обеспечения улучшенной экспрессии антигенсвязывающих белков, включая моноспецифические и биспецифические антитела, в эукариотических клетках, в частности, в линиях клеток китайского хомячка (*Cricetulus griseus*), посредством применения нескольких локусов, обеспечивающих повышенную экспрессию.

046654 B1

046654 B1

Перекрестная ссылка на родственную заявку

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США №62/325400, поданной 20 апреля 2016 г., полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к сайт-специфической интеграции и экспрессии рекомбинантных белков в эукариотических клетках. В частности, настоящее изобретение относится к композициям и способам для обеспечения улучшенной экспрессии антигенсвязывающих белков (в том числе, моноспецифических и биспецифических антител) в эукариотических клетках, в частности, в линиях клеток китайского хомячка (*Cricetulus griseus*) посредством применения локусов, обеспечивающих повышенную экспрессию.

Уровень техники

Клеточные системы экспрессии направлены на обеспечение надежного и эффективного источника производства определенного белка для исследовательского или терапевтического применения. Экспрессия рекомбинантного белка в клетках млекопитающих представляет собой предпочтительный способ получения белков для терапевтического применения, в связи, например, со способностью систем экспрессии млекопитающих соответствующим образом посттрансляционно модифицировать рекомбинантные белки.

Несмотря на доступность различных систем экспрессии, проблема эффективного переноса гена и стабильности интегрированного гена для экспрессии рекомбинантного белка существует до сих пор. Один фактор для длительной экспрессии целевого трансгена представляет собой минимальное разрушение генов клетки для того, чтобы избежать изменений фенотипа линии клеток.

Разработка стабильных линий клеток с размещением множественных генов для экспрессии, например, множественных цепей антител, как в случае мультиспецифических антител, является особенно проблематичной. Могут иметь место широкие вариации уровней экспрессии интегрированных генов. Интеграция дополнительных генов может приводить к большей вариации экспрессии и нестабильности вследствие локального генетического окружения (т.е. эффектов положения). Системы экспрессии для получения мультиспецифических антигенсвязывающих белков часто требуют экспрессии двух или больше разных цепей иммуноглобулина, предназначенных для образования пары в виде специфического мультимерного формата, и при этом часто могут положительно влиять на получение гомодимера, а не требуемого гетеродимера или мультимерной комбинации. Соответственно, в данной области техники существует потребность в улучшенных системах экспрессии млекопитающих.

Краткое описание изобретения

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает клетку, которая содержит несколько экзогенных нуклеиновых кислот, сайт-специфически интегрированных в два локуса, обеспечивающих повышенную экспрессию, где несколько экзогенных нуклеиновых кислот вместе кодируют антигенсвязывающий белок. Антигенсвязывающий белок может представлять собой биспецифический антигенсвязывающий белок или общепринятый моноспецифический антигенсвязывающий белок.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрена клетка, которая содержит первую экзогенную нуклеиновую кислоту, интегрированную в первый локус, обеспечивающий повышенную экспрессию, и вторую экзогенную нуклеиновую кислоту, интегрированную во второй локус, обеспечивающий повышенную экспрессию; где первая и вторая экзогенные нуклеиновые кислоты вместе кодируют антигенсвязывающий белок.

В некоторых вариантах осуществления первая экзогенная нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первый фрагмент тяжелой цепи (HCF), а вторая экзогенная нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первый фрагмент легкой цепи (LCF).

В некоторых вариантах осуществления вторая экзогенная нуклеиновая кислота дополнительно включает нуклеотидную последовательность, кодирующую второй HCF (также HCF*). Первый и второй HCF могут являться одинаковыми или разными, как в случае биспецифического антигенсвязывающего белка. Каждая нуклеотидная последовательность, кодирующая HCF или LCF, может кодировать аминокислоты из константного участка. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая первый HCF, кодирует первый домен СН3, а нуклеотидная последовательность, кодирующая второй HCF (HCF*), кодирует второй домен СН3. В некоторых вариантах осуществления первый и второй домены СН3 могут отличаться по меньшей мере в одном аминокислотном положении, таком как положение, которое приводит к отличию характеристик связывания белка А. В других вариантах осуществления нуклеотидные последовательности, кодирующие первый и второй домены СН, отличаются друг от друга тем, что одна из нуклеотидных последовательностей была модифицирована с помощью кодона.

В некоторых вариантах осуществления первая экзогенная нуклеиновая кислота (содержащая первую нуклеотидную последовательность, кодирующую HCF) дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую второй LCF. Во второй экзогенной нуклеиновой кислоте второй LCF

может являться одинаковым по сравнению с первым LCF или отличающимся от него.

Во многих вариантах осуществления клетки, предусмотренной в данном документе, каждая из нуклеотидных последовательностей, кодирующих HCF или LCF, независимо функционально связана с промотором таким образом, что транскрипция каждой последовательности, кодирующей HCF или LCF, регулируется отдельно.

В некоторых вариантах осуществления первый RRS и второй RRS расположены соответственно с 5'-конца и 3'-конца относительно первой экзогенной нуклеиновой кислоты, а третий RRS и четвертый RRS расположены соответственно с 5'-конца и 3'-конца относительно второй экзогенной нуклеиновой кислоты, где первый и второй RRS отличаются, и третий и четвертый RRS отличаются. Обычно RRS, находящиеся в паре с RRS, фланкирующие экзогенную нуклеиновую кислоту, отличаются во избежание нежелательной рекомбинации и удаления экзогенной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления все из первого, второго, третьего и четвертого RRS отличаются друг от друга.

В вариантах осуществления, где первая экзогенная нуклеиновая кислота в первом локусе включает первую нуклеотидную последовательность, кодирующую HCF, а вторая экзогенная нуклеиновая кислота во втором локусе включает как первую последовательность, кодирующую LCF, так и вторую последовательность, кодирующую HCF, первый дополнительный RRS может находиться между нуклеотидной последовательностью, кодирующей первый LCF, и нуклеотидной последовательностью, кодирующей второй HCF. Дополнительный RRS может отличаться от каждого из первого, второго, третьего и четвертого RRS. В некоторых вариантах осуществления первый дополнительный RRS включен между промотором, с которым функционально связан ген селективируемого маркера, и геном селективируемого маркера, или дополнительный RRS может быть включен в ген селективируемого маркера или в интрон гена селективируемого маркера, который находится между первой последовательностью, кодирующей LCF, и последовательностью, кодирующей HCF, или между первой последовательностью, кодирующей HCF, и второй последовательностью, кодирующей HCF.

В вариантах осуществления, где первая экзогенная нуклеиновая кислота в первом локусе включает первую нуклеотидную последовательность, кодирующую HCF, и вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую HCF, и вторая экзогенная нуклеиновая кислота во втором локусе включает как первую последовательность, кодирующую LCF, так и вторую последовательность, кодирующую HCF, при этом первый RRS и второй RRS могут находиться соответственно с 5'-конца и 3'-конца относительно первой экзогенной нуклеиновой кислоты, а третий RRS и четвертый RRS могут находиться соответственно с 5'-конца и 3'-конца относительно второй экзогенной нуклеиновой кислоты, где первый и второй RRS отличаются, и третий и четвертый RRS отличаются. В некоторых вариантах осуществления первый и второй HCF являются одинаковыми, и первый и второй LCF являются одинаковыми, причем в таких случаях RRS можно конструировать таким образом, что первый и третий RRS являются одинаковыми и второй и четвертый RRS являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления первый и второй HCF отличаются, и первый и второй LCF являются одинаковыми, причем в таких случаях RRS можно конструировать таким образом, что все из первого, второго, третьего и четвертого RRS отличаются друг от друга. Независимо от того, являются ли два HCF одинаковыми или отличаются, дополнительный RRS может находиться между первой последовательностью, кодирующей LCF, и второй последовательностью, кодирующей HCF, и/или находится между второй последовательностью, кодирующей LCF, и первой последовательностью, кодирующей HCF. Дополнительный (находящийся в середине) RRS отличается от каждого из первого, второго, третьего и четвертого RRS. Дополнительный RRS можно включать в ген селективируемого маркера или в интрон гена селективируемого маркера, расположенный между двумя последовательностями, кодирующими HCF/LCF.

В другом аспекте предусмотрены клетки, которые содержат пары RRS, интегрированные в два локуса, обеспечивающие повышенную экспрессию, которые можно применять для интеграции нуклеиновых кислот, кодирующих антигенсвязывающие белки, посредством RMCE.

В определенных вариантах осуществления предусмотрены клетки, которые содержат пары RRS, интегрированные в два локуса, обеспечивающие повышенную экспрессию, которые можно применять для одновременной интеграции нуклеиновых кислот, кодирующих антигенсвязывающие белки, посредством RMCE в присутствии рекомбиназы.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрена клетка, которая содержит интегрированные в первый локус, обеспечивающий повышенную экспрессию, в направлении от 5'-конца к 3'-концу: первый RRS, первую экзогенную нуклеиновую кислоту и второй RRS; и интегрированные во второй локус, обеспечивающий повышенную экспрессию, в направлении от 5'-конца к 3'-концу: третий RRS, вторую экзогенную нуклеиновую кислоту и четвертый RRS; где первый и второй RRS отличаются, и третий и четвертый RRS отличаются.

В некоторых вариантах осуществления первая экзогенная нуклеиновая кислота включает первый ген селективируемого маркера, а вторая экзогенная нуклеиновая кислота включает второй ген селективируемого маркера, где первый и второй гены селективируемого маркера отличаются.

В некоторых вариантах осуществления одна из первой и второй экзогенных нуклеиновых кислот или обе могут включать дополнительный RRS, т.е. дополнительный RRS между первым и вторым RRS в

первом локусе и/или дополнительный RRS между третьим и четвертым RRS. Дополнительный расположенный в середине RRS отличается от RRS на 5'- и 3'-концах. Если дополнительный RRS включен между 5'-RRS и 3'-RRS (например, между первым и вторым RRS), то один ген селективируемого маркера может быть включен между 5'-RRS и дополнительным (находящимся в середине) RRS, а другой отличающийся ген селективируемого маркера может быть включен между дополнительным RRS и 3'-RRS.

В другом варианте осуществления в клетке предусмотрена первая экзогенная нуклеиновая кислота, которая включает третий RRS, т.е. дополнительный RRS между первым и вторым RRS в первом локусе, где первый и второй RRS фланкируют два селективируемых маркера на 5'- и 3'-концах кассеты экспрессии. В других вариантах осуществления вторая экзогенная нуклеиновая кислота может также включать идентичный третий RRS, т.е. дополнительный RRS между первым и вторым RRS во втором локусе, где первый и второй RRS фланкируют два селективируемых маркера на 5'- и 3'-концах кассеты экспрессии. Четыре гена селективируемого маркера, включенные между первым, третьим и вторым RRS, отличаются друг от друга.

В другом варианте осуществления в клетке предусмотрена первая экзогенная нуклеиновая кислота, которая включает третий RRS, т.е. дополнительный RRS между первым и вторым RRS в первом локусе, где первый и второй RRS фланкируют два селективируемых маркера на 5'- и 3'-концах кассеты экспрессии. В других вариантах осуществления вторая экзогенная нуклеиновая кислота может включать шестой RRS, т.е. дополнительный RRS между четвертым и пятым RRS во втором локусе, где четвертый и пятый RRS фланкируют два селективируемых маркера на 5'- и 3'-концах кассеты экспрессии. Четыре гена селективируемого маркера, включенные между RRS, отличаются друг от друга.

Во многих вариантах осуществления клетки, предусмотренные в данном документе, представляют собой клетки линии CHO.

В различных вариантах осуществления два используемых локуса, обеспечивающих повышенную экспрессию, выбраны из группы, состоящей из локуса, содержащего нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 1, локуса, содержащего нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 2, и локуса, содержащего нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 3.

В дополнительном аспекте предусмотрены наборы векторов для интеграции и экспрессии биспецифических антигенсвязывающих белков в клетке.

В некоторых вариантах осуществления набор векторов включает первый вектор, содержащий в направлении от 5'-конца к 3'-концу первый RRS, первую нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую первый HCF и второй RRS; второй вектор, содержащий в направлении от 5'-конца к 3'-концу третий RRS, вторую нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую второй HCF, четвертый RRS; и нуклеотидную последовательность, кодирующую первый LCF, который находится либо в первой нуклеиновой кислоте в первом векторе, либо находится в третьем векторе, отличающемся от первого и второго векторов; где первый, второй, третий и четвертый RRS отличаются; и где биспецифический антигенсвязывающий белок содержит первый HCF, второй HCF и первый LCF, и где первый и второй HCF отличаются.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая первый LCF, находится в первой нуклеиновой кислоте в первом векторе. В некоторых вариантах осуществления первая нуклеиновая кислота дополнительно включает первый ген селективируемого маркера.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая первый LCF, предусмотрена в третьем векторе и фланкирована 5'-RRS и 3'-RRS, при этом (i) 3'-RRS является одинаковым по сравнению с первым RRS, а 5'-RRS отличается от первого и второго RRS, или, в качестве альтернативы, (ii) 5'-RRS является одинаковым по сравнению со вторым RRS, а 3'-RRS отличается от первого и второго RRS. В некоторых вариантах осуществления векторы можно конструировать таким образом, что общий RRS, разделяемый первым и третьим векторами, предусмотрен в формате расщепленного гена селективируемого маркера (или в формате гена, разделенного интроном), например, расположенного на 3'-конце 5'-части гена селективируемого маркера в одном из первого и третьего векторов, и расположенного на 5'-конце оставшейся 3'-части гена селективируемого маркера в другом векторе.

В некоторых вариантах осуществления набор векторов дополнительно включает нуклеотидную последовательность, кодирующую второй LCF, которая предусмотрена либо во второй нуклеиновой кислоте во втором векторе, либо в четвертом векторе отдельно от первого, второго и третьего векторов.

В некоторых вариантах осуществления первый и второй LCF являются одинаковыми.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая первый LCF, включена в первую нуклеиновую кислоту в первом векторе, а нуклеотидная последовательность, кодирующая второй VL, предусмотрена в четвертом векторе. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая второй LCF, в четвертом векторе фланкирована 5'-RRS и 3'-RRS, где (i) 3'-RRS является одинаковым по сравнению с третьим RRS, а 5'-RRS отличается от третьего и четвертого RRS или (ii) 5'-RRS является одинаковым по сравнению с четвертым RRS, а 3'-RRS отличается от третьего и четвертого RRS. В определенных вариантах осуществления векторы сконструированы таким образом, что общий RRS, разделяемый вторым и четвертым векторами, предусмотрен в форма-

те расщепленного маркера (например, посредством интрона), например, расположенного на 3'-конце 5'-части гена селективируемого маркера в одном из второго и четвертого векторов и расположен на 5'-конце оставшейся 3'-части гена селективируемого маркера в другом векторе.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая первый LCF, находится в первой нуклеиновой кислоте в первом векторе, а нуклеотидная последовательность, кодирующая второй VL, находится во второй нуклеиновой кислоте во втором векторе.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая первый LCF, находится в третьем векторе, а нуклеотидная последовательность, кодирующая второй VL, находится в четвертом векторе. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая первый LCF, в третьем векторе фланкирована 5'-RRS и 3'-RRS, где (i) 3'-RRS в третьем векторе является одинаковым по сравнению с первым RRS, а 5'-RRS в третьем векторе отличается от первого и второго RRS, или (ii) 5'-RRS в третьем векторе является одинаковым по сравнению со вторым RRS, а 3'-RRS в третьем векторе отличается от первого и второго RRS; и где нуклеотидная последовательность, кодирующая второй LCF, в четвертом векторе фланкирована 5'-RRS и 3'-RRS, где (i) 3'-RRS в четвертом векторе является одинаковым по сравнению с третьим RRS, а 5'-RRS в четвертом векторе отличается от третьего и четвертого RRS, или (ii) 5'-RRS в четвертом векторе является одинаковым по сравнению с четвертым RRS, а 3'-RRS в четвертом векторе отличается от третьего и четвертого RRS.

Во многих вариантах осуществления набора векторов, предусмотренного в данном документе, нуклеотидная последовательность, кодирующая первый HCF, может кодировать первый домен CH3, а нуклеотидная последовательность, кодирующая второй HCF, может кодировать второй домен CH3. В некоторых вариантах осуществления первый и второй домены CH3 отличаются на по меньшей мере одну аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидные последовательности, кодирующие первый и второй домены CH3, отличаются тем, что одна из нуклеотидных последовательностей была модифицирована с помощью кодона.

Во многих вариантах осуществления набора векторов, предусмотренного в данном документе, каждая из нуклеотидных последовательностей, кодирующих HCF или LCF, является независимо связанной с промотором.

В некоторых вариантах осуществления набор векторов может дополнительно включать нуклеотидную последовательность, кодирующую одну или более рекомбиназ, которые распознают один или более RRS, которые могут быть включены в один из векторов, кодирующих LCF или HCF, или предусмотрены в отдельном векторе.

В еще одних вариантах осуществления предусмотрен набор векторов, который включает первый вектор, содержащий первую нуклеиновую кислоту, фланкированную 5'-концевым гомологичным плечом и 3'-концевым гомологичным плечом, для интеграции в первый локус, обеспечивающий повышенную экспрессию в клетке; и второй вектор, содержащий вторую нуклеиновую кислоту, фланкированную 5'-концевым гомологичным плечом и 3'-концевым гомологичным плечом, для интеграции во второй локус, обеспечивающий повышенную экспрессию в клетке; где первая и вторая нуклеиновые кислоты вместе кодируют антигенсвязывающий белок.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает системы, которые включают комбинацию клетки (например, клетки CHO) с одним или более векторами и которые можно использовать для получения клеток, характеризующихся интегрированными в два локуса, обеспечивающих повышенную экспрессию, экзогенными нуклеиновыми кислотами, которые вместе кодируют антигенсвязывающий белок, или моноспецифический белок, или биспецифический белок. Системы могут быть предусмотрены в виде набора, например.

В определенных вариантах осуществления предусмотрена система, которая включает клетку и набор векторов, где клетка содержит интегрированный в два отдельных локуса, обеспечивающих повышенную экспрессию, своего генома набор RRS, которые отличаются друг от друга и расположены с промежутками между одной или более экзогенными нуклеиновыми кислотами, такими как селективируемые маркеры, для обмена посредством рекомбинации с помощью генов, представляющих интерес, в наборе векторов; и где RRS в наборе векторов предусмотрены в том же порядке, что и RRS в клетке.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрена система, которая включает клетку и набор векторов, где клетка содержит интегрированный в первый локус, обеспечивающий повышенную экспрессию: в направлении от 5'-конца к 3'-концу первый RRS, первую экзогенную нуклеиновую кислоту и второй RRS, и интегрированный во второй локус, обеспечивающий повышенную экспрессию: в направлении от 5'-конца к 3'-концу третий RRS, вторую экзогенную нуклеиновую кислоту и четвертый RRS; где первый и второй RRS отличаются, и третий и четвертый RRS отличаются; и где первый и второй локусы, обеспечивающие повышенную экспрессию, отличаются; где набор векторов включает (i) первый вектор, содержащий в направлении от 5'-конца к 3'-концу 5'-RRS первого вектора, первую нуклеиновую кислоту и 3'-RRS первого вектора, где 5'- и 3'-RRS первого вектора отличаются; (ii) второй вектор, содержащий в направлении от 5'-конца к 3'-концу 5'-RRS второго вектора, вторую нуклеиновую кислоту и 3'-RRS второго вектора, где 5'- и 3'-RRS второго вектора отличаются; и (iii) нуклеотидную последовательность, кодирующую первый HCF, и нуклеотидную последовательность, кодирующую первый LCF,

где одна из двух нуклеотидных последовательностей, кодирующих тяжелую цепь, представляет собой первую нуклеиновую кислоту, а другие нуклеотидные последовательности представляют собой вторую нуклеиновую кислоту; где первый HCF и первый LCF представляют собой участки антигенсвязывающего белка; и где в результате введения векторов в клетку первая и вторая нуклеиновые кислоты в векторах интегрируются соответственно в первый локус, обеспечивающий повышенную экспрессию, и во второй локус, обеспечивающий повышенную экспрессию, посредством рекомбинации, опосредованной RRS.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой моноспецифический антигенсвязывающий белок.

В некоторых вариантах осуществления первый и третий RRS являются одинаковыми, и второй и четвертый RRS являются одинаковыми. В определенных вариантах осуществления первый дополнительный RRS присутствует между первым и вторым RRS в первом локусе. В некоторых вариантах осуществления 5'-RRS первого вектора является одинаковым по сравнению с первым и третьим RRS; 3'-RRS первого вектора, 5'-RRS второго вектора и первый дополнительный RRS являются одинаковыми; и 3'-RRS второго вектора является одинаковым по сравнению со вторым и четвертым RRS. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая LCF, находится в первом векторе, а нуклеотидная последовательность, кодирующая HCF, находится во втором векторе. В некоторых вариантах осуществления 3'-RRS первого вектора расположен на 3'-конце 5'-части гена селективируемого маркера, а 5'-RRS второго вектора расположен на 5'-конце оставшейся 3'-части гена селективируемого маркера. В других вариантах осуществления 5'-RRS первого вектора является одинаковым по сравнению с первым RRS, а 3'-RRS первого вектора является одинаковым по сравнению со вторым RRS; и где 5'-RRS второго вектора является одинаковым по сравнению с третьим RRS, а 3'-RRS второго вектора является одинаковым по сравнению с четвертым RRS.

В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой биспецифический антигенсвязывающий белок.

В некоторых вариантах осуществления набор векторов в системе дополнительно включает нуклеотидную последовательность, кодирующую второй HCF, который отличается от первого HCF.

В некоторых вариантах осуществления обе из нуклеотидной последовательности, кодирующей первый LCF, и нуклеотидной последовательности, кодирующей второй HCF, включены в первую нуклеиновую кислоту в первом векторе, а нуклеотидная последовательность, кодирующая первый HCF, находится во втором векторе. В некоторых вариантах осуществления 5'-RRS первого вектора является одинаковым по сравнению с первым RRS, 3'-RRS первого вектора является одинаковым по сравнению со вторым RRS, 5'-RRS второго вектора является одинаковым по сравнению с третьим RRS, а 3'-RRS второго вектора является одинаковым по сравнению с четвертым RRS.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая второй HCF, находящаяся в третьем отдельном векторе, фланкирована 5'-RRS третьего вектора и 3'-RRS третьего вектора. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая первый LC, находится в первом векторе, нуклеотидная последовательность, кодирующая первый HCF, находится во втором векторе, 5'-RRS первого вектора является одинаковым по сравнению с первым RRS, 3'-RRS первого вектора является одинаковым по сравнению с 5'-RRS второго вектора и первым дополнительным RRS, и 3'-RRS второго вектора является одинаковым по сравнению со вторым RRS, 5'-RRS третьего вектора является одинаковым по сравнению с третьим RRS, и 3'-RRS третьего вектора является одинаковым по сравнению с четвертым RRS, где первый дополнительный RRS включен в первый локус между первым и вторым RRS. В некоторых вариантах осуществления векторы сконструированы для обеспечения общего RRS в формате с расщепленным маркером, например, 3'-RRS первого вектора, расположен на 3'-конце 5'-части гена селективируемого маркера, включенного в первый вектор, и 5'-RRS второго вектора, расположен на 5'-конце оставшегося гена селективируемого маркера, включенного во второй вектор.

В некоторых вариантах осуществления набор векторов системы дополнительно включает нуклеотидную последовательность, кодирующую второй LCF, который может являться одинаковым по сравнению с первым LCF или отличающимся от него.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая второй LCF, находится во второй нуклеиновой кислоте второго вектора, при этом 5'-RRS первого вектора является одинаковым по сравнению с первым RRS, 3'-RRS первого вектора является одинаковым по сравнению со вторым RRS, 5'-RRS второго вектора является одинаковым по сравнению с третьим RRS, а 3'-RRS второго вектора является одинаковым по сравнению с четвертым RRS.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая второй LCF, находящаяся в третьем отдельном векторе, фланкирована 5'-RRS третьего вектора и 3'-RRS третьего вектора. В некоторых вариантах осуществления 5'- и 3'-RRS первого вектора являются идентичными соответственно первому и второму RRS в первом локусе; 5'-RRS третьего вектора является одинаковым по сравнению с третьим RRS, 3'-RRS третьего вектора является одинаковым по сравнению с 5'-RRS второго вектора и дополнительным RRS, присутствующим между третьим и четвертым RRS во втором локусе, 3'-RRS второго вектора является одинаковым по сравнению с четвертым RRS. В некоторых вариан-

тах осуществления общих RRS сконструирован в формате с расщепленным маркером, например, 3'-RRS третьего вектора расположен на 3'-конце 5'-части гена селективируемого маркера, включенного в третий вектор, и 5'-RRS второго вектора, расположен на 5'-конце оставшейся 3'-части гена селективируемого маркера, включенного во второй вектор.

Во многих вариантах осуществления системы, предусмотренной в данном документе, нуклеотидная последовательность, кодирующая HCF или LCF, может кодировать аминокислоты из константного участка. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая первый HCF, может кодировать первый домен СНЗ, а нуклеотидная последовательность, кодирующая второй HCF, может кодировать второй домен СНЗ. В некоторых вариантах осуществления первый и второй домены СНЗ отличаются на по меньшей мере одну аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидные последовательности, кодирующие первый и второй домены СНЗ, отличаются тем, что одна из нуклеотидных последовательностей была модифицирована с помощью кодона.

Во многих вариантах осуществления системы, предусмотренной в данном документе, каждая из нуклеотидных последовательностей, кодирующих HCF или LCF, является независимо связанной с промотором.

В некоторых вариантах осуществления набор векторов системы может дополнительно включать нуклеотидную последовательность, кодирующую одну или более рекомбиназ, которые распознают один или более RRS, которые могут быть включены в один из векторов, кодирующих HCF или LCF, или предусмотрены в отдельном векторе.

В различных вариантах осуществления клетка в системе, предусмотренной в данном документе, представляет собой клетку CHO.

В различных вариантах осуществления два локуса, обеспечивающих повышенную экспрессию, выбраны из группы, состоящей из локуса, содержащего нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1, локуса, содержащего нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 2, и локуса, содержащего нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 3.

В другом аспекте настоящее изобретение также предусматривает способы получения биспецифических антигенсвязывающих белков. В одном варианте осуществления способа используют систему, раскрытую в данном документе, и внедряют векторы системы в клетку системы посредством трансфекции. Трансфицированные клетки, где экзогенные нуклеиновые кислоты были надлежащим образом интегрированы посредством RMCE в два локуса клетки, обеспечивающих повышенную экспрессию, можно подвергнуть скринингу и идентифицировать. Полипептиды, содержащие HCF, и полипептиды, содержащие LCF, могут быть экспрессированы из интегрированных нуклеиновых кислот, а антигенсвязывающий белок, представляющий интерес, можно получить из идентифицированной трансфицированной клетки и очистить с применением известных способов.

В другом варианте осуществления способа просто используют клетку, описанную выше в данном документе, которая содержит экзогенные нуклеиновые кислоты, интегрированные в два локуса, обеспечивающие повышенную экспрессию, которые вместе кодируют антигенсвязывающий белок и экспрессируют антигенсвязывающий белок из клетки.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Иллюстративная стратегия клонирования антител для интеграции в один локус, обеспечивающий повышенную экспрессию, в сравнении с несколькими локусами, обеспечивающими повышенную экспрессию, для общепринятого моноспецифического антитела. Два вектора трансфицировали в клетку-хозяина, первый вектор, несущий нуклеиновую кислоту, кодирующую цепь антитела 1 (AbC1), такую как легкая цепь, и второй вектор, несущий нуклеиновую кислоту, кодирующую цепь антитела 2 (AbC2), такую как тяжелая цепь, и селективируемый маркер, отличающийся от маркеров, интегрированных в целевой локус клетки-хозяина. От 5'-конца к 3'-концу: сайт RRS1, расположенные в середине сайты RRS3 и RRS2 векторных конструкций соответствуют сайтам RRS, фланкирующим селективируемые маркеры в локусах клетки-хозяина. Дополнительный вектор, трансфицированный в клетки-хозяева, кодирует рекомбиназу. Если селективируемый маркер второго вектора представляет собой ген устойчивости к антибиотикам, и поскольку два вектора сконструированы для объединения и обеспечения возможности экспрессии маркера, положительные рекомбинантные клоны выбраны для роста в антибиотике. В качестве альтернативы флуоресцентный маркер позволяет осуществлять селекцию положительных клонов посредством анализа сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS). Такие же векторы можно применять для сайт-специфической интеграции в отдельный локус, такой как локус EES YR® (локус 1).

Фиг. 2. С применением стратегии клонирования двух векторов с целью интеграции в один локус, обеспечивающий повышенную экспрессию, по сравнению с двумя локусами, антитело А и антитело В клонировали в локусы, как показано на фиг. 1. Клетки, экспрессирующие антитело, выделяли и подвергли 12-дневному культивированию с подпиткой с последующим отбором проб и осуществлением анализа Octet для определения титра с применением сенсоров белка А. Было также обнаружено, что клетки являются изогенными и стабильными. Обнаруживали увеличение суммарного титра от 0,5 до 0,9 раза благодаря использованию способа интеграции двух сайтов.

Фиг. 3. Иллюстративная стратегия клонирования антител для интеграции в один локус, обеспечивающий повышенную экспрессию, в сравнении с интеграцией в два отдельных локуса, обеспечивающих повышенную экспрессию, для биспецифического антитела, кодируемого тремя цепями антител. Для данной биспецифической стратегии использовали три вектора, первый вектор, несущий нуклеиновую кислоту, кодирующую цепи антитела 1 (AbC1), например, общую легкую цепь, фланкированную RRS1 и RRS3, для интеграции в EESYR® (SEQ ID NO: 1; локус 1); второй вектор, несущий цепь антитела 2 (AbC2), например, тяжелую цепь, имеющую предшествующий селективируемый маркер, фланкированную RRS4 и RRS6, для интеграции в локус SEQ ID NO: 2; и дополнительно третий вектор, несущий нуклеиновую кислоту, кодирующую вторую копию AbC1, связанную с селективируемым маркером, отличающимся от такового во втором векторе, и связанную с цепью антитела 3 (AbC3), например, вторую (отличающуюся) тяжелую цепь, фланкированную 5'-RRS4 и 3'-RRS5 в кассете вектора (5'- и 3'-RRS соответствуют сайтам RRS в клетке-хозяине в локусе, содержащем SEQ ID NO: 2). Как показано, двухвекторную систему можно использовать для сайт-специфической интеграции в отдельном локусе, таком как локус EESYR® (содержащем SEQ ID NO: 1; локус 1). Анализировали титры из соответствующих линий клеток-продуцентов, см. фиг. 5.

Фиг. 4. Иллюстративная стратегия клонирования антител для интеграции в один локус, обеспечивающий повышенную экспрессию, в сравнении с интеграцией в два отдельных локуса, обеспечивающих повышенную экспрессию, для биспецифического антитела, кодируемого тремя или четырьмя цепями антител. Для данной биспецифической стратегии использовали четыре вектора, первый вектор, несущий нуклеиновую кислоту, кодирующую цепь антитела 1 (AbC1), например, первую легкую цепь, фланкированную RRS1 и RRS3, для интеграции в EESYR® (SEQ ID NO: 1; локус 1); второй вектор, несущий цепь антитела 2 (AbC2), например, тяжелую цепь, имеющую предшествующий селективируемый маркер, фланкированную 5'-RRS3 и 3'-RRS2, также для интеграции в локус EESYR® (содержащий (SEQ ID NO: 1; локус 1); и третий вектор, несущий нуклеиновую кислоту, кодирующую селективируемый маркер, отличающийся от того, что во втором векторе, и связанную с цепью антитела 3 (AbC3), например, вторую (отличающуюся) тяжелую цепь, фланкированную 5'-RRS6 и 3'-RRS5 в кассете вектора (5'- и 3'-RRS соответствуют сайтам RRS в клетке-хозяине в локусе, содержащем SEQ ID NO: 2; локус 2); и дополнительно четвертый вектор, несущий нуклеиновую кислоту, кодирующую вторую легкую цепь, например, цепь антитела 1 (AbC1) (однако, она может являться одинаковой по сравнению с первой легкой цепью или отличающейся от нее). Как показано, четырехвекторную систему можно использовать для сайт-специфической интеграции в двух локусах, таких как локус EESYR® (содержащий SEQ ID NO: 1; локус 1) и локус, содержащий SEQ ID NO: 2 или 3. Четырехвекторная система в сравнении с двухвекторной системой интеграции в одном локусе (локус EESYR®; локус 1).

Фиг. 5. С применением стратегии клонирования двух векторов с целью интеграции в один локус, обеспечивающий повышенную экспрессию, по сравнению с двумя локусами, клонировали биспецифическое антитело С и биспецифическое антитело D, клетки выделяли и подвергали 12-дневному культивированию с подпиткой с последующим отбором проб и осуществлением анализа Octet для определения титра с применением иммобилизованного антитела к Fc и второго антитела к Fc* (модифицированного идентифицирующего антитела к Fc, см. документ US 2014-0134719 A1, опубликованный 15 мая 2014 г.). Было также обнаружено, что клетки являются изогенными и стабильными. Обнаруживали увеличение общего биспецифического титра (образования гетеродимеров) от 1,75 до 2 раз благодаря использованию способа интеграции двух сайтов в сравнении с экспрессией биспецифического антитела (гетеродимера) в одном сайте интеграции.

Фиг. 6А и 6В. Биспецифическое антитело E (Ab E), биспецифическое антитело F (Ab F), биспецифическое антитело G (Ab G) и биспецифическое антитело H (Ab H) клонировали в RSX или RSX^{2BP}. Каждая клетка, экспрессирующая биспецифическое антитело, содержит (общую) легкую цепь нуклеотида, тяжелую цепь нуклеотида (Fc дикого типа) и модифицированную тяжелую цепь нуклеотида (Fc*) либо в одном локусе, обеспечивающем повышенную экспрессию (RSX), либо в двух локусах, обеспечивающих повышенную экспрессию (RSX^{2BP}). Клетки выделяли и подвергали 13-дневному культивированию с подпиткой в биореакторах с последующим отбором проб и применением способа элюирования HPLC для определения суммарного титра антител и титра биспецифических антител (фиг. 6А). Отношение титра разновидностей биспецифических антител (выделенных из гомодимерных разновидностей) к общему титру антител определяли в виде процентного значения от общего титра Ab (фиг. 6В).

Фиг. 7. Моноспецифические антитела J и K (Ab J и Ab K соответственно) клонировали в RSX или RSX². Клетки выделяли и подвергали 13-дневному культивированию с подпиткой в биореакторах с последующим отбором проб и применением способов HPLC для определения суммарных титров IgG.

Подробное описание изобретения

Определения.

Используемый в данном документе термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулинов, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь может содержать переменный участок тяжелой

цепи (сокращенно обозначаемый в данном документе как HCVR или VH) и константный участок тяжелой цепи. Константный участок тяжелой цепи содержит три домена: CH1, CH2, CH3 и шарнир. Каждая легкая цепь содержит переменный участок легкой цепи (сокращенно обозначаемый в данном документе как LCVR или VL) и константный участок легкой цепи. Константный участок легкой цепи содержит один домен CL. VH- и VL-участки могут быть дополнительно подразделены на участки гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность участками (CDR), чередующиеся с более консервативными участками, называемыми каркасными участками (FR). Каждый VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (CDR тяжелой цепи могут быть сокращены как HCDR1, HCDR2 и HCDR3; CDR легкой цепи могут быть сокращены как LCDR1, LCDR2 и LCDR3).

Фраза "антигенсвязывающий белок" включает белок, который имеет по меньшей мере один CDR и способен к селективному распознаванию антигена, т.е. способен к связыванию антигена kd, которая находится по меньшей мере в микромолярном диапазоне. Для терапевтических антигенсвязывающих белков (например, терапевтических антител) часто требуется kd, которая находится в наномолярном или пикомолярном диапазоне. Обычно, антигенсвязывающий белок включает два или больше CDR, например, 2, 3, 4, 5 или 6 CDR. Примеры антигенсвязывающих белков включают антитела, антигенсвязывающие фрагменты антител, такие как полипептиды, содержащие переменные участки тяжелых цепей и легких цепей антитела (например, Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент), и белки, содержащие переменные участки тяжелых цепей и легких цепей антитела и содержащие дополнительные аминокислоты из константных участков тяжелых и/или легких цепей (таких как один или более константных доменов, т.е., один или более доменов CL, CH1, шарниров, CH2 и CH3).

Фраза "биспецифический антигенсвязывающий белок" включает антигенсвязывающие белки, способные к селективному связыванию или обладающие отличающейся специфичностью в отношении двух или больше эпитопов, либо в отношении двух разных молекул (например, антигенов), либо в отношении такой же молекулы (например, в отношении такого же антигена). Антигенсвязывающая часть или фрагмент антигенсвязывающей части (Fab) такого белка обуславливают специфичность в отношении конкретного антигена и обычно содержат переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи иммуноглобулина. В некоторых случаях переменный участок тяжелой цепи или переменный участок легкой цепи могут не представлять собой родственную пару, другими словами, характеризоваться разными специфичностями связывания.

Пример биспецифического антигенсвязывающего белка представляет собой "биспецифическое антитело", которое включает антитело, способное селективно связываться с двумя или больше эпитопами. Как правило, биспецифические антитела содержат две различные тяжелые цепи, при этом каждая тяжелая цепь специфически связывается с отличающимся эпитопом либо двух разных молекул (например, антигенов), либо такой же молекулы (например, такого же антигена). Если биспецифический антигенсвязывающий белок способен селективно связываться с двумя разными эпитопами (первым эпитопом и вторым эпитопом), то аффинность переменного участка первой тяжелой цепи в отношении первого эпитопа, как правило, будет на по меньшей мере один, два, или три, или четыре порядка ниже аффинности переменного участка первой тяжелой цепи в отношении второго эпитопа и наоборот. Биспецифические антигенсвязывающие белки, такие как биспецифические антитела, могут включать переменные участки тяжелых цепей, которые распознают разные эпитопы одного и того же антигена. Типичное биспецифическое антитело имеет две тяжелые цепи, каждая из которых имеет три CDR тяжелой цепи с последующими (от N-конца к C-концу) доменом CH1, шарниром, доменом CH2 и доменом CH3, и легкую цепь иммуноглобулина, которая либо не придает антигенсвязывающую специфичность, но может ассоциироваться с каждой тяжелой цепью, либо которая может ассоциироваться с каждой тяжелой цепью и может связываться с одним или более эпитопами, связанными с антигенсвязывающими участками тяжелой цепи, либо которая может ассоциироваться с каждой тяжелой цепью и способна связываться с одной или обеими тяжелыми цепями с одним или обоими эпитопами. В одном варианте осуществления Fc-домен включает по меньшей мере CH2 и CH3. Fc-домен может включать шарнир, домен CH2 и домен CH3.

Один осуществленный биспецифический формат включает первую тяжелую цепь (HC), вторую тяжелую цепь, которая имеет модифицированный CH3 (HC*), и общую легкую цепь (LC) (две копии одной и той же легкой цепи). Другой вариант осуществления включает первую тяжелую цепь (HC), общую LC и слитый полипептид HC-ScFv (где вторая HC является слитой с N-концом ScFv). Другой вариант осуществления включает первую HC, родственную LC, слитый полипептид HC-ScFv (где второй HC является слитым с N-концом ScFv). Другой вариант осуществления включает первую тяжелую цепь (HC), LC и Fc-домен. Другой вариант осуществления включает первую HC, LC, слитый полипептид ScFv-Fc (где Fc является слитым с C-концом ScFv). Другой вариант осуществления включает первую HC, общую LC и слитый полипептид Fc-ScFv (где Fc является слитым с N-концом ScFv). Другой вариант осуществления включает первую HC, LC и ScFv-HC (где второй HC является слитым с C-концом ScFv).

В определенных вариантах осуществления одна тяжелая цепь (HC) может представлять собой нативную последовательность или последовательность "дикого типа", а вторая тяжелая цепь может являть-

ся модифицированной в Fc-домене. В других вариантах осуществления одна тяжелая цепь (HC) может представлять собой нативную последовательность или последовательность "дикого типа", а вторая тяжелая цепь может являться модифицированной по кодонам.

Термин "клетка" включает любую клетку, которая является подходящей для экспрессии последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты и имеет локус, который обеспечивает стабильную интеграцию и повышенную экспрессию экзогенной нуклеиновой кислоты. Клетки включают клетки млекопитающих, такие как клетки животного, отличного от человека, клетки человека или продукты слияния клеток, такие как, например, гибридомы или квадромы. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека, обезьяны, человекообразной обезьяны, хомяка, крысы или мыши. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающего, выбранную из следующих клеток: CHO (например, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggio-CHO), COS (например, COS-7), клетки сетчатки, Vero, CV1, клетки почки (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60 (например, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (эпидермальные), CV-1, U937, 3T3, L-клетки, клетки C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, клетки Сертоли, клетки BRL 3A, клетки HT1080, клетки миеломы, опухольевые клетки и линии клеток, полученной из вышеупомянутых клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит один или более вирусных генов, например, клетка сетчатки, которая экспрессирует вирусный ген (например, клетка PER.C6™).

"Плотность клеток" относится к количеству клеток на объем образца, например, в виде общего количества клеток (жизнеспособных и мертвых) на мл. Количество клеток можно подсчитать вручную или посредством автоматизированной системы, такой как проточный питомер. Автоматические счетчики клеток были адаптированы для подсчета количества жизнеспособных или мертвых, или как жизнеспособных, так и мертвых клеток с применением, например, стандартной методики с поглощением трипанового синего. Фраза "плотность жизнеспособных клеток" или "концентрация жизнеспособных клеток" относится к количеству жизнеспособных клеток на объем образца (также называемому "численностью жизнеспособных клеток"). Любое количество хорошо известных проводимых вручную или автоматизированных методик можно применять для определения плотности клеток. Параметры биомассы культуры можно измерять в реальном времени, если электропроводность или оптическая плотность коррелирует с количеством клеток на объем. Конечная плотность клеток в культуре клеток, такой как в производственная культура, варьирует в зависимости от исходной линии клеток, например, в диапазоне от приблизительно $1,0$ до 10×10^6 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления достигают конечной плотности клеток, составляющей от $1,0$ до 10×10^6 клеток/мл, перед сбором белка, представляющего интерес, из производственной культуры клеток. В других вариантах осуществления достигают конечной плотности клеток, составляющей более $5,0 \times 10^6$ клеток/мл, более 6×10^6 клеток/мл, более 7×10^6 клеток/мл, более 8×10^6 клеток/мл, более 9×10^6 клеток/мл или более 10×10^6 клеток/мл.

Термин "модифицированная по кодонам" подразумевает, что нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, была модифицирована по одному или более нуклеотидам, т.е. по одному или более кодонам без изменений аминокислот, кодируемых кодонами, с получением модифицированной по кодонам версии нуклеотидной последовательности. Модификация по кодонам нуклеотидной последовательности может обеспечить подходящее основание того, чтобы различать нуклеотидную последовательность из данной модифицированной по кодонам версии в анализе, основанном на применении нуклеиновой кислоты (например, среди прочего, в анализе на основе гибридизации, ПЦР). В некоторых случаях кодоны нуклеотидной последовательности модифицировали для обеспечения улучшенной или оптимизированной экспрессии кодируемого белка в клетке-хозяине посредством применения хорошо известных из уровня техники методик оптимизации кодонов (Gustafsson, C, et al., 2004, Trends in Biotechnology, 22:346-353; Chung, B.K.-S., et al., 2013, Journal of Biotechnology, 167:326-333; Gustafsson, C, et al., 2012, Protein Expr Purif, 83(1): 37-46). Инструменты в виде программного обеспечения для конструирования последовательностей с применением таких методик также являются хорошо известными из уровня техники, включая без ограничения, среди прочего, Codon optimizer (Fuglsang A. 2003, Protein Expr Purif, 31:247-249), Gene Designer (Villalobos A, et al., 2006, BMC Bioinforma, 7:285) и OPTIMIZER (Puigbo P, et al. 2007, Nucleic Acids Research, 35:W126-W131).

Фраза "определяющий комплементарность участок" или термин "CDR" включают аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты генов иммуноглобулина организма, которая в норме (т.е. у животного дикого типа) находится между двумя каркасными участками в варибельном участке легкой или тяжелой цепей молекулы иммуноглобулина (например, антитела или рецептора Т-клетки). CDR может кодироваться, например, последовательностью зародышевой линии или перегруппированной, или неперегруппированной последовательностями, и, например, наивными или зрелыми В-клеткой или Т-клеткой. В некоторых случаях (например, в случае CDR3) CDR могут кодироваться двумя или более последовательностями (например, последовательностями зародышевой линии), которые не являются смежными (например, в случае последовательности неперегруппированной нуклеиновой кислоты), но они являются смежными в последовательности нуклеиновой кислоты в В-клетке, например, как результат сплайсинга или соединения последовательностей (например, V-D-J-

рекомбинация с образованием CDR3 тяжелой цепи).

Термин "локус, обеспечивающий повышенную экспрессию" относится к локусу в геноме клетки, который содержит последовательность или последовательности и характеризуется более высоким уровнем экспрессии в сравнении с другими участками или последовательностями в геноме, если подходящий ген или конструкция являются экзогенно добавленными (т.е. интегрированными) в или вблизи последовательности или последовательностей или "функционально связанными" с последовательностью или последовательностями.

Термин "повышенный" при использовании для описания повышенной экспрессии включает повышение экспрессии от по меньшей мере в приблизительно 1,5 раза до повышения по меньшей мере в приблизительно 3 раза по сравнению с тем, что обычно наблюдают при случайной интеграции экзогенной последовательности в геном или при интеграции в другой локус, например, по сравнению с популяцией случайных интегрантов отдельной копии одной и той же конструкции для экспрессии. Наблюдаемое повышение кратности экспрессии при применении последовательностей по настоящему изобретению представлено в сравнении с уровнем экспрессии одного и того же гена, измеренной при практически таких же условиях в отсутствие последовательности по настоящему изобретению, например, в сравнении с интеграцией в другой локус в геноме одного и того же вида. Повышенная эффективность рекомбинации включает повышение способности локуса к рекомбинации (например, применять сайты распознавания для рекомбиназы ("RRS")). Повышение относится к эффективности рекомбинации по сравнению со случайной рекомбинацией, например, без применения сайтов распознавания для рекомбиназы или подобного, которая обычно составляет 0,1%. Предпочтительная эффективность повышенной рекомбинации является приблизительно в 10 раз выше по сравнению со случайной или составляет приблизительно 1%. Если не указано иное, заявленное изобретение не ограничено специфической эффективностью рекомбинации. Локусы, обеспечивающие повышенную экспрессию, обычно поддерживают высокую продуктивность белка, представляющего интерес, в клетке-хозяине. Следовательно, повышенная экспрессия включает высокую продуктивность белка, представляющего интерес, (улучшенный титр в граммах белка) на клетку, а не достижение высоких титров просто посредством большого количества копий клеток в культуре. Удельная продуктивность Qp (пг/клетка/день, т.е. pcd) считается мерой устойчивой продуктивности. Требуемыми являются рекомбинантные клетки-хозяева, характеризующиеся значением Qp, составляющим более 5 pcd, или более 10 pcd, или более 15 pcd, или более 20 pcd, или более 25 pcd, или даже более 30 pcd. Клетки-хозяева с геном, представляющим интерес, вставленным в локус, обеспечивающий повышенную экспрессию, или в "горячую точку", характеризуются высокой удельной продуктивностью.

Если фраза "экзогенно добавленный ген", "экзогенно добавленная нуклеиновая кислота" или просто "экзогенная нуклеиновая кислота" применяется в отношении локуса, представляющего интерес, то данная фраза относится к любой последовательности ДНК или гену, не присутствующему в локусе, представляющем интерес, как в локусе, встречающемся в природе. Например, "экзогенная нуклеиновая кислота" в локусе СНО (например, в локусе, содержащем последовательность под SEQ ID NO: 1 или под SEQ ID NO: 2), может представлять собой ген хомяка, не встречающийся в конкретном локусе СНО в природе (т.е. ген хомяка из другого локуса генома хомяка), ген от любого другого вида (например, ген человека), химерный ген (например, человека/мыши) или любой другой ген, который не существует в природе содержащимся в локусе СНО, представляющем интерес.

Фраза "тяжелая цепь" или "тяжелая цепь иммуноглобулина" включает последовательность константного участка тяжелой цепи иммуноглобулина из любого организма и, если не указано иное, включает переменный домен тяжелой цепи. Переменные домены тяжелой цепи включают три CDR тяжелой цепи и четыре участка FR, если не указано иное. Типичная тяжелая цепь после переменного домена (от N-конца к C-концу) имеет домен CH1, шарнир, домен CH2 и домен CH3. Термин "фрагмент тяжелой цепи" включает пептид, состоящий из по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или больше аминокислот тяжелой цепи, и может включать один или более CDR, один или более CDR, комбинированных с одним или более FR, один или более CH1, шарниров, CH2 или CH3, переменный участок, константный участок, фрагменты константного участка (например, CH1, CH2 CH3) или их комбинации. Примеры HCF включают VH и полные Fc-участки или их части. Фраза "нуклеотидная последовательность, кодирующая HCF" включает нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептид, состоящий из HCF, и нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептид, содержащий HCF, например, полипептиды, которые могут содержать дополнительные аминокислоты кроме указанного HCF. Например, нуклеотидная последовательность, кодирующая HCF, включает нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептиды, состоящие из VH, состоящие из VH, связанных с CH3, состоящие, среди прочего, из полной тяжелой цепи.

"Гомологичная последовательность" в контексте последовательностей нуклеиновых кислот относится к последовательности, которая практически гомологична эталонной последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления две последовательности считаются практически гомологичными, если по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше их соответствующих нуклеотидов являются идентичными на протяжении рассматриваемого фрагмента остатков. В некоторых вариантах осуществления рассматри-

ваемый фрагмент представляет собой цельную (т.е. полную) последовательность.

Фраза "легкая цепь" включает последовательность константного участка легкой цепи иммуноглобулина из любого организма и, если не указано иное, включает каппа и лямбда легкие цепи человека. Варибельные (VL) домены легкой цепи, как правило, включают три CDR легкой цепи и четыре каркасных (FR) участка, если не указано иное. Как правило, легкая цепь полной длины включает, от аминоконца к карбоксильному концу, домен VL, который включает FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 и константный домен легкой цепи. Легкие цепи, которые можно применять согласно настоящему изобретению, включают, например, такие, которые не связываются селективно либо с первым, либо со вторым эпитопом, селективно связанным биспецифическим антителом. Подходящие легкие цепи также включают такие, которые могут связываться или способствовать связыванию с одним или обоими эпитопами, которые связаны антигенсвязывающими участками антитела. Термин "фрагмент из легкой цепи" или "фрагмент легкой цепи" (или "LCF") включает пептид, состоящий из по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или больше аминокислот легкой цепи, и может включать один или более CDR, один или более CDR, комбинированных с одним или более FR, варибельный участок, константный участок, фрагменты константного участка или их комбинации. Примеры LCF включают VL и полные константные участки легкой цепи или их части ("CL"). Фраза "нуклеотидная последовательность, кодирующая LCF" включает нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептид, состоящий из LCF, и нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептид, содержащий LCF, например, полипептиды, которые могут содержать дополнительные аминокислоты кроме указанного LCF. Например, нуклеотидная последовательность, кодирующая LCF, включает нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептиды, состоящие из VL, или состоящие, среди прочего, из полной легкой цепи.

Фраза "функционально связанный" относится к связыванию нуклеиновых кислот или белков таким образом, что связанные молекулы функционируют как предполагается. Участки ДНК являются функционально связанными, если они функционально сопряжены друг с другом. Например, промотор является функционально связанным с кодирующей последовательностью, если промотор способен участвовать в транскрипции последовательности; сайт связывания рибосомы является функционально связанным с кодирующей последовательностью, если он расположен таким образом, что обеспечивает трансляцию. Как правило, "функционально связанный" может включать, но не требует, смежное расположение. В случае последовательностей, таких как секреторные лидерные последовательности, смежное расположение и правильность размещения в рамке считывания представляют собой типичные признаки. Последовательность, обеспечивающая повышенную экспрессию, локуса, представляющего интерес, функционально связана с геном, представляющим интерес (GOI), при этом она функционально сопряжена с GOI, например, где ее присутствие приводит к повышенной экспрессии GOI.

"Процентная идентичность" при описании локуса, представляющего интерес, такого как с SEQ ID NO: 1 или с SEQ ID NO: 2, или их фрагмента, подразумевает включение гомологичных последовательностей, которые характеризуются упомянутой идентичностью в пределах участков непрерывной гомологии, но при расчете процентной идентичности не принимают во внимание присутствие гэпов, делеций или вставок, которые не имеют гомолога в сравниваемой последовательности.

Как используется в данном документе, определение "процентной идентичности" между, например, SEQ ID NO: 1 или ее фрагментом и видовой гомологом не будет включать сравнение последовательностей, где видовой гомолог не имеет гомологичной последовательности для сравнения при выравнивании (т.е. SEQ ID NO: 1 или ее фрагмент имеет вставку в этой точке, или видовой гомолог имеет гэп или делецию, в зависимости от обстоятельств). Таким образом, "процентная идентичность" не включает штрафы за гэпы, делеции и вставки.

"Сайт распознавания" или "последовательность распознавания" представляет собой специфическую последовательность ДНК, распознаваемую нуклеазой или другим ферментом с целью связывания и направления сайт-специфического расщепления остова ДНК. Эндонуклеазы расщепляют ДНК в молекуле ДНК. Сайты распознавания также называются в данной области техники целевыми сайтами распознавания.

"Сайт распознавания для рекомбиназы" (или "RRS") представляет собой специфическую последовательность ДНК, распознаваемую рекомбиназой, такой как Cre-рекомбиназа (Cre) или флиппаза (flp). Сайт-специфические рекомбиназы могут осуществлять перестройки ДНК, включая делеции, инверсии и транслокации, если одну или более из их целевых последовательностей распознавания стратегически помещают в геном организма. В одном примере Cre специфически опосредует явления рекомбинации в своем целевом сайте распознавания ДНК loxP, который состоит из двух инвертированных повторов по 13 п.о., разделенных спейсером из 8 п.о. Можно применять больше одного сайта распознавания для рекомбиназы, например, для облегчения обусловленного рекомбиназой обмена ДНК. Также можно применять варианты или мутанты сайтов распознавания для рекомбиназ, например, сайты lox (Araki, N. et al, 2002, Nucleic Acids Research, 30:19, e103).

"Обмен кассетами, опосредованный рекомбиназой" или "RMCE", относится к способу точного замещения геномной целевой кассеты донорной кассетой. Молекулярные композиции, обычно предусмотренные для осуществления данного способа, включают 1) геномную целевую кассету, фланкированную

как в направлении 5', так и в направлении 3', целевыми сайтами распознавания, специфическими в отношении конкретной рекомбиназы, 2) донорную кассету, фланкированную подходящими целевыми сайтами распознавания, и 3) сайт-специфическую рекомбиназу. Белки рекомбиназы хорошо известны из уровня техники (Turan, S. and Bode J., 2011, FASEB J., 25, pp. 4088-4107) и обеспечивают точное расщепление ДНК в специфическом целевом сайте распознавания (последовательности ДНК) без добавления или потери нуклеотидов. Общепринятые комбинации рекомбиназа/сайт включают без ограничения Cre/lox и Flp/frt. В коммерчески доступных наборах также предусмотрены векторы, содержащие сайт R4-attP и вектор, кодирующий интегразу phiC31 для RMCE. (См. также, например, заявку на патент США с № US20130004946).

"Сайт-специфическая интеграция" или "нацеленная вставка" относятся к способам целенаправленного воздействия на гены для непосредственной вставки или интеграции гена или последовательности нуклеиновой кислоты в определенное положение в геноме, т.е. для направления ДНК к специфическому сайту между двумя нуклеотидами в непрерывной полинуклеотидной цепи. Сайт-специфическую интеграцию или нацеленную вставку можно также осуществлять в отношении конкретной нуклеиновой кислоты, которая включает несколько единиц экспрессии или кассет, таких как несколько генов, каждый из которых имеет собственные регуляторные элементы (такие как промоторы, энхансеры и/или последовательности терминации транскрипции). "Вставку" и "интеграцию" применяют взаимозаменяемо. Подразаумевается, что вставка гена или последовательности нуклеиновой кислоты (например, последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей кассету экспрессии) может приводить к замене или делеции (или может быть выполнена для замены или делеции) одной или более нуклеиновых кислот, в зависимости от используемой методики редактирования генома.

"Стабильная интеграция" означает, что экзогенная нуклеиновая кислота, интегрированная в геном клетки-хозяина, остается интегрированной в течение длительного периода времени в культуре клеток, например, по меньшей мере 7 дней, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 15 дней, по меньшей мере 20 дней, по меньшей мере 25 дней, по меньшей мере 30 дней, по меньшей мере 35 дней, по меньшей мере 40 дней, по меньшей мере 45 дней, по меньшей мере 50 дней, по меньшей мере 55 дней, по меньшей мере 60 дней или дольше. Понятно, что получение биспецифических антигенсвязывающих белков с целью получения и очищения в крупных масштабах представляет собой сложную задачу. Стабильность и клональные свойства являются необходимыми для воспроизводимости любой биомолекулы, особенно предназначенной для терапевтического применения. Стабильные клоны, экспрессирующие биспецифические антитела, полученные посредством способов согласно настоящему изобретению, обеспечивают надежный и воспроизводимый путь получения терапевтических биомолекул.

Общее описание.

В настоящем изобретении предусмотрены композиции и способы для обеспечения улучшенной экспрессии нескольких полипептидов в клетке-хозяине, в частности в линиях клеток китайского хомячка (*Cricetulus griseus*), посредством использования нескольких (например, двух) локусов, обеспечивающих повышенную экспрессию, в клетке-хозяине. Более конкретно, в настоящем изобретении предусмотрены композиции и способы, предназначенные для интеграции нескольких экзогенных нуклеиновых кислот, которые вместе кодируют антигенсвязывающий белок, в несколько локусов, обеспечивающих повышенную экспрессию, в клетке-хозяине, такой как клетка CHO, сайт-специфическим образом. В частности, в настоящем изобретении предусмотрены клетки, содержащие несколько экзогенных нуклеиновых кислот, интегрированных в несколько локусов, обеспечивающих повышенную экспрессию, где несколько экзогенных нуклеиновых кислот вместе кодируют антигенсвязывающий белок. В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены векторы на основе нуклеиновой кислоты, сконструированные для сайт-специфической интеграции нескольких экзогенных нуклеиновых кислот в несколько локусов, обеспечивающих повышенную экспрессию. В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены системы, которые включают клетку-хозяина, у которой каждый из нескольких локусов, обеспечивающих повышенную экспрессию, содержит несколько сайтов распознавания для рекомбиназы (RRS), и набор векторов, содержащих соответствующие RRS и несколько экзогенных нуклеиновых кислот, для сайт-специфической интеграции нескольких экзогенных нуклеиновых кислот из векторов в несколько локусов, обеспечивающих повышенную экспрессию. Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрены способы получения антигенсвязывающего белка с применением клеток, векторов и систем, раскрытых в данном документе.

Клетки, содержащие несколько экзогенных нуклеиновых кислот, сайт-специфически интегрированных в несколько локусов, обеспечивающих повышенную экспрессию.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает клетку, которая содержит несколько экзогенных нуклеиновых кислот, сайт-специфически интегрированных в два локуса, обеспечивающих повышенную экспрессию, где несколько экзогенных нуклеиновых кислот вместе кодируют антигенсвязывающий белок. Антигенсвязывающий белок может представлять собой биспецифический антигенсвязывающий белок или общепринятый (т.е. моноспецифический) антигенсвязывающий белок.

Клетки, предусмотренные в данном документе, способны продуцировать требуемый антигенсвязывающий белок в высоких титрах и/или с высокой удельной продуктивностью (пг/клетка/день). В некото-

рых вариантах осуществления клетка продуцирует антигенсвязывающий белок с титром, составляющим по меньшей мере 1 г/л, 1,5 г/л, 2,0 г/л, 2,5 г/л, 3,0 г/л, 3,5 г/л, 4,0 г/л, 4,5 г/л, 5,0 г/л, 10 г/л или больше. В некоторых вариантах осуществления клетка, которая продуцирует антигенсвязывающий белок, характеризуется удельной продуктивностью, составляющей по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 пикограмм/клетка/день или больше, которую определяют на основании общего количества антигенсвязывающих белков (в пг), продуцируемых клеткой в день.

Клетки-хозяева, содержащие экзогенные нуклеиновые кислоты, которые вместе кодируют антигенсвязывающий белок и интегрированы в два локуса, обеспечивающие повышенную экспрессию, характеризуются высокой плотностью клеток в производственной культуре, например, $1-10 \times 10^6$ клеток/мл. В других вариантах осуществления клетка-хозяин, в которой кодируется антигенсвязывающий белок, достигает конечной плотности клеток, составляющей по меньшей мере 5×10^6 клеток/мл, 6×10^6 клеток/мл, 7×10^6 клеток/мл, 8×10^6 клеток/мл, 9×10^6 клеток/мл или 10×10^6 клеток/мл (в производственной культуре).

В некоторых вариантах осуществления предусмотрена клетка, которая способна продуцировать биспецифический антигенсвязывающий белок при соотношении титра биспецифического антигенсвязывающего белка и общего титра антигенсвязывающих белков, составляющем по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60% или больше. В некоторых вариантах осуществления предусмотрена клетка, которая способна продуцировать биспецифический антигенсвязывающий белок, где соотношение титра биспецифического антигенсвязывающего белка и общего титра антигенсвязывающих белков, продуцируемых клеткой, составляет по меньшей мере 50%.

В других вариантах осуществления предусмотрена клетка, которая способна продуцировать антигенсвязывающий белок, где общий титр антигенсвязывающих белков, продуцируемых при экспрессии двух локусов, при сравнении с общим титром антигенсвязывающих белков, продуцируемых при экспрессии одного локуса, составляет по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60% или больше. В определенных вариантах осуществления предусмотрена клетка, которая способна продуцировать антигенсвязывающий белок, где общий титр антигенсвязывающих белков, продуцируемых при экспрессии двух локусов, превышает в по меньшей мере 0,5 раза, 0,75 раза, 1 раз, 1,5 раза, 1,75 раза, 2 раза или более общий титр антигенсвязывающих белков, продуцируемых при экспрессии одного локуса, при их сравнении.

В некоторых вариантах осуществления клетка содержит первую экзогенную нуклеиновую кислоту, интегрированную в конкретный сайт в пределах первого локуса, обеспечивающего повышенную экспрессию; и вторую экзогенную нуклеиновую кислоту, интегрированную в конкретный сайт в пределах второго локуса, обеспечивающего повышенную экспрессию; где первая и вторая экзогенные нуклеиновые кислоты вместе кодируют антигенсвязывающий белок. Первая и вторая экзогенные нуклеиновые кислоты вместе предусматривают несколько нуклеотидных последовательностей, кодирующих HCF (несколько HCF) или LCF (несколько LCF) (например, вариабельные участки) антигенсвязывающего белка. Например, для моноспецифических антител может предусматриваться одна нуклеотидная последовательность, кодирующая HCF (например, VH), и одна нуклеотидная последовательность, кодирующая LCF (например, VL) моноспецифического антигенсвязывающего белка, или несколько копий (например, две копии) каждой из них. Для биспецифических антител могут предусматриваться две нуклеотидные последовательности, каждая из которых кодирует HCF (при этом обычно два HCF отличаются друг от друга), одна или две копии нуклеотидной последовательности, кодирующей LCF, или две нуклеотидные последовательности, кодирующие два разных LCF. В зависимости от того, является ли антигенсвязывающий белок моноспецифическим или биспецифическим, нуклеотидные последовательности, кодирующие HCF (несколько HCF) или LCF (несколько LCF) (например, вариабельные участки), могут быть интегрированы в разных вариациях или комбинациях в два локуса, обеспечивающих повышенную экспрессию. Например, для получения моноспецифических антигенсвязывающих белков в одном случае нуклеотидную последовательность, кодирующую HCF, и нуклеотидную последовательность, кодирующую LCF, можно интегрировать по отдельности в два локуса, по одной на каждый локус; тогда как в другом случае нуклеиновую кислоту, кодирующую HCF и LCF, интегрируют в один локус, и отдельную нуклеиновую кислоту, кодирующую такой же HCF и такие же LCF, интегрируют в другой локус. Для получения биспецифических антигенсвязывающих белков в одном случае нуклеотидную последовательность, кодирующую первый HCF и LCF, можно интегрировать в первый локус, при этом нуклеотидную последовательность, кодирующую второй HCF, интегрируют во второй локус, где два HCF отличаются, а LCF является общим LCF биспецифического антигенсвязывающего белка; и в другом случае нуклеотидную последовательность, кодирующую первый HCF и LCF, интегрируют в первый локус, а нуклеотидную последовательность, кодирующую второй HCF и такой же LCF, интегрируют во второй локус.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая HCF или LCF, может кодировать аминокислоты константного участка. Например, нуклеотидная последовательность, кодирующая HCF или LCF, может кодировать одно или несколько из CL, CH1, CH2, CH3 или комбинации CH1, CH2 или CH3 или может кодировать целый константный участок. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая HCF, кодирует домен CH3. В кон-

кретных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая ННCF, кодирует тяжелую цепь. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая LCF, кодирует легкую цепь.

В вариантах осуществления, где предусматриваются два HCF, нуклеотидная последовательность, кодирующая первый HCF, может кодировать аминокислоты первого константного участка, а нуклеотидная последовательность, кодирующая второй HCF, может кодировать аминокислоты второго константного участка, где аминокислоты двух константных участков могут быть одинаковыми или отличаться по меньшей мере по одному положению (такому как положения, обуславливающие разные характеристики связывания с белком А, или другие положения, описанные в данном документе ниже для различных биспецифических антигенсвязывающих белков). Независимо от отличий в аминокислотах две нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислоты двух константных участков, можно различать посредством модификации одного или более кодонов в одной нуклеотидной последовательности, что обеспечивает подходящее основание для того, чтобы различать две нуклеотидные последовательности в анализе, основанном на применении нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления каждая нуклеотидная последовательность, кодирующая HCF или LCF, независимо и функционально связана с последовательностью, регулирующей транскрипцию, которая предусматривает промотор. Под "независимо" подразумевается, что каждая кодирующая последовательность функционально связана с отдельной последовательностью, регулирующей транскрипцию, такой как промотор, таким образом, что транскрипция кодирующих последовательностей находится под регуляцией и контролем отдельных элементов. В некоторых вариантах осуществления промоторы, управляющие транскрипцией двух полипептидов, содержащих HCF, являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления все из промоторов, управляющих транскрипцией двух полипептидов, содержащих HCF, а также промотора, управляющего транскрипцией полипептида, содержащего VL, являются одинаковыми, например, представляют собой промотор CMV. В некоторых вариантах осуществления каждая нуклеотидная последовательность, кодирующая HCF или LCF, независимо и функционально связана с индуцируемым или репрессируемым промотором. Индуцируемые и репрессируемые промоторы обеспечивают возможность того, чтобы продуцирование происходило только в фазе продуцирования (культура с подпиткой), а не в ходе фазы роста (культура, выращиваемая в системе посевных ферментеров); или с точностью контролировать дифференциальную экспрессию компонентов антитела (HCF и LCF) в разных локусах. Точного контроля продуцирования (экспрессии) продукта каждого гена можно достигать посредством разных промоторов.

В одном таком примере клетки сначала конструируют так, чтобы они экспрессировали тетрациклин-зависимый репрессорный белок (TetR), и каждую нуклеотидную последовательность, кодирующую HCF и LCF, помещают под транскрипционный контроль промотора, активность которого регулирует TetR. Два расположенных друг за другом оператора TetR (TetO) помещают непосредственно ниже промотора CMV. В некоторых вариантах осуществления каждая нуклеотидная последовательность, кодирующая HCF и/или LCF, независимо и функционально связана с промотором, расположенным выше по меньшей мере одного оператора TetR (TetO) или оператора Arg (ArgO). В других вариантах осуществления каждая нуклеотидная последовательность, кодирующая HCF и/или LCF, независимо и функционально связана с гибридными промоторами CMV/TetO или CMV/ArgO. Дополнительные подходящие промоторы описаны в данном документе ниже.

В некоторых вариантах осуществления несколько экзогенных нуклеиновых кислот, интегрированных в два локуса, фланкированы RRS. Например, первый RRS и второй RRS расположены соответственно с 5'-конца и 3'-конца относительно первой экзогенной нуклеиновой кислоты, интегрированной в первый локус, а третий RRS и четвертый RRS расположены соответственно с 5'-конца и 3'-конца относительно второй экзогенной нуклеиновой кислоты, интегрированной во второй локус, где первый и второй RRS отличаются, и третий и четвертый RRS отличаются. В некоторых вариантах осуществления все из первого, второго, третьего и четвертого RRS отличаются друг от друга. В других вариантах осуществления первый и третий RRS являются одинаковыми, и второй и четвертый RRS являются одинаковыми, где первая экзогенная нуклеиновая кислота кодирует HCF и LCF, и вторая экзогенная нуклеиновая кислота кодирует такие же HCF и LCF.

В некоторых вариантах осуществления, где экзогенная нуклеиновая кислота, интегрированная в определенный локус, включает две нуклеотидные последовательности, кодирующие HCF или LCF, дополнительный RRS может быть включен между двумя нуклеотидными последовательностями. Такой дополнительный RRS должен отличаться от двух RRS, фланкирующих экзогенную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления дополнительный RRS вставлен в интрон гена селективируемого маркера, который включен в интегрированную экзогенную нуклеиновую кислоту и размещен между двумя нуклеотидными последовательностями, кодирующими HCF или LCF. После транскрипции и посттрансляционного процессинга интрон будет вырезаться с получением мРНК, кодирующей селективируемый маркер. В варианте осуществления, где как экзогенная нуклеиновая кислота, интегрированная в первый локус, так и экзогенная нуклеиновая кислота, интегрированная во второй локус, включают две последовательности, кодирующие HCF или LCF (например, LCF-HCF1 и LCF-HCF2), дополнительный

RRS может быть включен только в одну из первой и второй экзогенных нуклеиновых кислот или в обе экзогенные нуклеиновые кислоты между двумя последовательностями, кодирующими HCF или LCF, в каждом локусе. Дополнительный RRS в первом локусе может быть одинаковым по сравнению с дополнительным RRS во втором локусе или отличаться от него. Каждый дополнительный RRS должен отличаться от двух RRS, фланкирующих экзогенную нуклеиновую кислоту, интегрированную в данный локус. Каждый дополнительный RRS необязательно может быть вставлен в интрон гена селективируемого маркера, при этом гены селективируемого маркера, содержащие интрон, могут быть разными в двух локусах.

Если в экзогенную нуклеиновую кислоту, интегрированную в определенный локус, включены несколько последовательностей, кодирующих HCF или LCF, то взаимное расположение нескольких кодирующих последовательностей в пределах локуса может меняться. Например, в вариантах осуществления, где интегрированная экзогенная нуклеиновая кислота включает нуклеотидную последовательность, кодирующую LCF, и нуклеотидную последовательность, кодирующую HCF, нуклеотидная последовательность, кодирующая LCF, может быть расположена выше или ниже относительно нуклеотидной последовательности, кодирующей HCF. В конкретных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая LCF, расположена выше относительно нуклеотидной последовательности, кодирующей HCF. Если оба локуса включают нуклеотидную последовательность, кодирующую LCF, и нуклеотидную последовательность, кодирующую HCF, то в конкретных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая LCF, расположена выше относительно нуклеотидной последовательности, кодирующей HCF, в обоих локусах.

В дополнительных вариантах осуществления предусмотрены клетки, которые содержат первую пару RRS, интегрированных в первый локус, обеспечивающий повышенную экспрессию, и вторую пару RRS, интегрированных во второй локус, обеспечивающий повышенную экспрессию, где два RRS в каждой паре отличаются. Такие клетки являются пригодными для приема нескольких экзогенных нуклеиновых кислот, подлежащих интеграции, которые вместе кодируют антигенсвязывающий белок.

В некоторых вариантах осуществления первая экзогенная нуклеиновая кислота находится между двумя RRS в первом локусе, а вторая экзогенная нуклеиновая кислота находится между двумя RRS во втором локусе. Каждая из первой и второй экзогенных нуклеиновых кислот могут кодировать один или более генов селективируемого маркера. Гены селективируемого маркера могут отличаться друг от друга.

В некоторых вариантах осуществления дополнительный RRS находится между двумя RRS, присутствующими в паре (т.е. 5'-RRS и 3'-RRS) в определенном локусе, где дополнительный RRS отличается как от 5'-RRS, так и 3'-RRS в данном локусе. В некоторых вариантах осуществления дополнительный RRS находится между 5'-RRS и 3'-RRS в одном из двух локусов; и в других вариантах осуществления дополнительный RRS находится между 5'-RRS и 3'-RRS в каждом из двух локусов. Если дополнительный RRS находится между 5'-RRS и 3'-RRS, то ген селективируемого маркера может быть включен между 5'-RRS и дополнительным RRS, и ген другого селективируемого маркера может быть включен между дополнительным RRS и 3'-RRS, при этом два селективируемых маркера отличаются.

Во многих описанных вариантах осуществления клетка представляет собой клетку CHO, где один из двух локусов, обеспечивающих повышенную экспрессию, выбран из группы, состоящей из нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 1, нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 2, и нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 3.

Биспецифические антигенсвязывающие белки.

Биспецифические антигенсвязывающие белки, такие как биспецифические антитела, подходящие для клонирования и продуцирования в клетках с помощью векторов и систем, описанных в настоящем изобретении, не ограничиваются любым конкретным форматом биспецифических антигенсвязывающих белков.

В различных вариантах осуществления биспецифический антигенсвязывающий белок включает два полипептида, каждый из которых содержит антигенсвязывающий фрагмент (например, HC) и домен CH3, где антигенсвязывающий фрагмент в двух полипептидах характеризуется разными специфичностями в отношении антигена, и где два домена CH3 являются гетеродимерными по отношению друг к другу, поскольку один из доменов CH3 был модифицирован в по меньшей мере одном аминокислотном положении для получения различных характеристик связывания с белком А у двух полипептидов. См., например, биспецифические антитела, описанные в патенте США 8586713. Таким образом, схему выделения, основанную на различном связывании с белком А, можно использовать для легкого отделения гетеродимерных биспецифических антигенсвязывающих белков от гомодимеров.

В некоторых вариантах осуществления биспецифический антигенсвязывающий белок включает две тяжелые цепи, которые характеризуются разными специфичностями в отношении антигена и отличаются доменом CH3 в по меньшей мере одном аминокислотном положении, что обеспечивает различные характеристики связывания с белком А у двух тяжелых цепей.

В некоторых вариантах осуществления два полипептида содержат домены CH3 IgG человека, где один из двух полипептидов содержит домен CH3 IgG человека, выбранного из IgG1, IgG2 и IgG4, и другой из двух полипептидов содержит модифицированный домен CH3 IgG человека, выбранного из IgG1,

IgG2 и IgG4, где модификация снижает или устраняет связывание модифицированного участка СНЗ с белком А. В конкретных вариантах осуществления один из двух полипептидов содержит домен СНЗ IgG1 человека, и другой из двух полипептидов содержит модифицированный домен СНЗ IgG1 человека, где модификация выбрана из группы, состоящей из (i) 95R и (ii) 95R и 96F согласно системе нумерации экзонов IMGT. В других конкретных вариантах осуществления модифицированный домен СНЗ содержит от одной до пяти дополнительных модификаций, выбранных из группы, состоящей из 16E, 18M, 44S, 52N, 57M и 82I согласно системе нумерации экзонов IMGT.

В других различных вариантах осуществления два полипептида содержат домены СНЗ IgG мыши, где один из двух полипептидов содержит домен СНЗ немодифицированного IgG мыши, и другой из двух полипептидов содержит модифицированный домен СНЗ IgG мыши, где модификация снижает или устраняет связывание модифицированного участка СНЗ с белком А. В различных вариантах осуществления участок СНЗ IgG мыши модифицируют так, чтобы он содержал конкретные аминокислоты в конкретных положениях (нумерация согласно EU), выбранных из группы, состоящей из 252T, 254T и 256T; 252T, 254T, 256T и 258K; 247P, 252T, 254T, 256T и 258K; 435R и 436F; 252T, 254T, 256T, 435R и 436F; 252T, 254T, 256T, 258K, 435R и 436F; 24tP, 252T, 254T, 256T, 258K, 435R и 436F; а также 435R. В конкретном варианте осуществления сделана конкретная группа модификаций, выбранная из групп, состоящих из: M252T, S254T, S256T; M252T, S254T, S256T, I258K; I247P, M252T, S254T, S256T, I258K; H435R, H436F; M252T, S254T, S256T, H435R, H436F; M252T, S254T, S256T, I258K, H435R, H436F; I247P, M252T, S254T, S256T, I258K, H435R, H436F; а также H435R.

В различных вариантах осуществления биспецифический антигенсвязывающий белок представляет собой гибрид моноклонального антитела или антигенсвязывающего белка мыши и крысы, например, гибрид IgG2a мыши и IgG2b крысы. Согласно данным вариантам осуществления биспецифическое антитело состоит из гетеродимера на основе двух антител, содержащего по одной паре тяжелой/легкой цепей каждого, которые соединены посредством их Fc-частей. Требуемый гетеродимер можно легко очистить из смеси двух исходных антител, являющихся гомодимерами, и биспецифического гетеродимера, поскольку свойства связывания биспецифического антитела с белком А отличаются от таковых у исходных антител: IgG2b крысы не связывается с белком А, тогда как IgG2a мыши - связывается. Следовательно, гетеродимер мыши-крысы связывается с белком А, но элюируется при более высоком значении pH, чем гомодимер IgG2a мыши, и это обеспечивает возможность селективной очистки биспецифического гетеродимера.

В других различных вариантах осуществления биспецифический антигенсвязывающий белок представлен в формате, который в данной области техники называется "выступы-во-впадины" (см., например, патент США № 7183076). В данных вариантах осуществления Fc-части двух антител сконструированы с обеспечением одного выпяченного "выступа" и другой комплементарной "впадины". В случае продуцирования в одной и той же клетке считается, что тяжелые цепи предпочтительно образуют гетеродимеры, а не гомодимеры, посредством связывания сконструированных "выступов" со сконструированными "впадинами".

В другом варианте осуществления первая тяжелая цепь и вторая тяжелая цепь содержат одну или более аминокислотных модификаций в домене СНЗ для обеспечения возможности взаимодействия между двумя тяжелыми цепями. Аминокислотные остатки в области контакта СНЗ-СНЗ можно заменять заряженной аминокислотой с обеспечением электростатически неблагоприятного состояния для образования гомодимера. (См., например, публикацию согласно РСТ № WO2009089004 и публикацию европейского патента № EP1870459).

В других вариантах осуществления первая тяжелая цепь содержит домен СНЗ изотипа IgA, а вторая тяжелая цепь содержит домен СНЗ IgG (или наоборот) для содействия предпочтительному образованию гетеродимеров. (См., например, публикацию согласно РСТ № WO2007110205).

В других вариантах осуществления посредством способов конструирования цепей иммуноглобулина можно обеспечивать различные форматы для содействия образованию гетеродимеров, как, например, обмен Fab-плечами (публикация согласно РСТ публикация согласно РСТ № WO2008119353; публикация согласно РСТ № WO2011131746), взаимодействие с суперспирализованным доменом (публикация согласно РСТ № WO2011034605) или образование пептидов с лейциновыми застежками (Kostelny, et al. J. Immunol. 1992, 148(5): 1547-1553).

Фрагменты тяжелой цепи иммуноглобулина (например, переменные участки), которые можно применять для получения биспецифических антигенсвязывающих белков, можно получать с применением любого способа, известного из уровня техники. Например, первая тяжелая цепь содержит переменный участок, кодируемый нуклеиновой кислотой, которая получена из генома зрелой В-клетки первого животного, которого иммунизировали первым антигеном, при этом первая тяжелая цепь специфически распознает первый антиген; и вторая тяжелая цепь содержит переменный участок, кодируемый нуклеиновой кислотой, которая получена из генома зрелой В-клетки второго животного, которого иммунизировали вторым антигеном, при этом вторая тяжелая цепь специфически распознает второй антиген. Последовательности переменного участка тяжелой цепи иммуноглобулина также можно получить с помощью любого другого способа, известного из уровня техники, например, с помощью фагового дис-

плея. В других примерах нуклеиновые кислоты, кодирующие переменные участки тяжелой цепи, включают таковые от антител, которые были описаны или иным образом доступны из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления одна из двух последовательностей, кодирующих тяжелую цепь, была модифицирована по кодонам с целью обеспечения подходящего основания для того, чтобы различать две кодирующие последовательности в анализах, основанных на применении нуклеиновой кислоты.

Биспецифические антитела, содержащие две тяжелые цепи, которые распознают два разных эпитопа (или два разных антигена), легче выделять, если они могут образовывать пары с одной и той же легкой цепью (т.е. легкими цепями, содержащими идентичные переменные и константные домены). Из уровня техники известен ряд способов получения легких цепей, которые могут образовывать пары с двумя тяжелыми цепями с различной специфичностью, при этом не нарушая или существенно не нарушая селективность и/или аффинность переменного домена тяжелой цепи в отношении его целевого антигена, как описано, например, в патенте США 8586713 и источниках, раскрытых в нем.

Биспецифические антигенсвязывающие белки могут характеризоваться двойными специфичностями в отношении различных антигенов и связанными с этим полезными применениями.

В некоторых примерах можно получить биспецифические антигенсвязывающие белки, демонстрирующие специфичность в отношении связывания опухолевого антигена и Т-клеточного антигена, которые нацеливаются на антиген на клетке, например, CD20, а также нацеливаются на антиген на Т-клетке, например, на рецептор Т-клетки, такой как CD3. Таким образом, биспецифический антигенсвязывающий белок нацеливается как на представляющую интерес клетку у пациента (например, В-клетку у пациента с лимфомой, посредством связывания с CD20), так и на Т-клетку у пациента. В различных вариантах осуществления биспецифический антигенсвязывающий белок сконструирован таким образом, чтобы при связывании с CD3 активировать Т-клетку, сопрягая, таким образом, активацию Т-клетки с конкретной выбранной опухолевой клеткой.

В контексте биспецифических антигенсвязывающих белков, где один фрагмент связывается с рецептором Т-клетки, как, например, связывается с CD3, а другой фрагмент связывается с целевым антигеном, целевой антиген может представлять собой опухоль-ассоциированный антиген. Неограничивающие примеры специфических опухоль-ассоциированных антигенов включают, например, AFP, ALK, белки BAGE, BIRC5 (сурвивин), BIRC7, β -катенин, bcr-ab1, BRCA1, BCMA, BORIS, CA9, карбоангидразу IX, каспазу-8, CALR, CCR5, CD19, CD20(MS4A1), CD22, CD30, CD40, CDK4, CEA, CLEC-12, CTLA4, циклин-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EpCAM, EphA2, Fra-1, FOLR1, белки GAGE (например, GAGE-1, -2), GD2, GD3, GloboH, глипикан-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, LMP2, белки MAGE (например, MAGE-1, -2, -3, -4, -6 и -12), MART-1, мезотелин, ML-IAP, Muc1, Muc2, Muc3, Muc4, Muc5, Muc16 (CA-125), MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA (FOLH1), белки RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, TAG-72, TGF- β , TMPRSS2, антиген Thompson-nouvelle (Tn), TRP-1, TRP-2, тирозиназу и уроплакин-3. В некоторых вариантах осуществления биспецифический антигенсвязывающий белок содержит один фрагмент, который связывает CD3. Иллюстративные фрагменты антитела к CD3 описаны в публ. заяв. на патент США №US2014/0088295A1 и US20150266966A1 и в международной публикации №WO 2017/053856, опубликованной 30 марта 2017 г., все из которых включены в данный документ посредством ссылки). В других вариантах осуществления биспецифический антигенсвязывающий белок содержит один фрагмент, который связывается с CD3, и один фрагмент, который связывается с BCMA, CD19, CD20, CD28, CLEC-12, Her2, белком HLA, белком MAGE, Muc16, PSMA или Steap-2. В еще одних вариантах осуществления биспецифический антигенсвязывающий белок выбран из группы, состоящей из биспецифического антитела к CD3 и CD20 (как описано в публ. заяв. на патент США №US2014/0088295A1 и US20150266966A1, включенных в данный документ посредством ссылки), биспецифического антитела к CD3 и муцину-16 (например, биспецифического антитела к CD3 и Muc16) и биспецифического антитела к CD3 и простатспецифическому мембранному антигену (например, биспецифического антитела к CD3 и PSMA).

В контексте биспецифических антигенсвязывающих белков, где один фрагмент связывается с рецептором Т-клетки, как, например, связывается с CD3, а другой фрагмент связывается с целевым антигеном, целевой антиген может представлять собой антиген, ассоциированный с инфекционным заболеванием. Неограничивающие примеры антигенов, ассоциированных с инфекционным заболеванием, включают, например, антиген, который экспрессируется на поверхности вирусной частицы или предпочтительно экспрессируется на клетке, инфицированной вирусом, где вирус выбран из группы, состоящей из HIV, вируса гепатита (A, B или C), вируса герпеса (например, HSV-1, HSV-2, CMV, HAV-6, VZV, вируса Эпштейна-Барра), аденовируса, вируса гриппа, флавивируса, эховируса, риновируса, вируса Коксаки, коронавируса, респираторно-синцитиального вируса, вируса эпидемического паротита, ротавируса, вируса кори, вируса краснухи, парвовируса, вируса коровьей оспы, HTLV, вируса денге, папилломавируса, вируса контагиозного моллюска, вируса полиомиелита, вируса бешенства, вируса JC и вируса арбовирусного энцефалита. В качестве альтернативы целевой антиген может представлять собой антиген, кото-

рый экспрессируется на поверхности бактерии или предпочтительно экспрессируется на клетке, инфицированной бактерией, где бактерия выбрана из группы, состоящей из хламидий, риккетсий, микобактерий, стафилококков, стрептококков, пневмококков, менингококков, гонококков, клебсиелл, протеев, серрагий, псевдомонад, легионелл, дифтерийной палочки, сальмонелл, бацилл, бактерий, вызывающих холеру, столбняк, ботулизм, сибирскую язву, чуму, лептоспир и бактерий, вызывающих болезнь Лайма. В определенных вариантах осуществления целевой антиген представляет собой антиген, который экспрессируется на поверхности гриба или предпочтительно экспрессируется на клетке, инфицированной грибом, где гриб выбран из группы, состоящей из *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis* и т.д.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger* и т.д.), представителей семейства Мукоровых (*mucor*, *absidia*, *rhizopus* и т.д.), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* и *Histoplasma capsulatum*. В определенных вариантах осуществления целевой антиген представляет собой антиген, экспрессируемый на поверхности паразита или предпочтительно экспрессируемый на клетке, инфицированной паразитом, где паразит выбран из группы, состоящей из *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Taenia crassiceps* и *Brugia malayi*. Неограничивающие примеры специфических патоген-ассоциированных антигенов включают, например, gp120 ВИЧ, CD4 ВИЧ, гликопротеид L вируса гепатита В, гликопротеид М вируса гепатита В, гликопротеид S вируса гепатита В, Е1 вируса гепатита С, Е2 вируса гепатита С, гепатоцит-специфический белок, gВ вируса простого герпеса, gВ цитомегаловируса и белок оболочки HTLV.

Также можно получить биспецифические связывающие белки, которые содержат два связывающих фрагмента, каждый из которых направлен на определенного партнера по связыванию (т.е. каждый направлен на разную мишень) на поверхности одной и той же клетки. Данная структура особенно подходит для нацеливания на конкретные клетки или типы клеток, в случае которых обе мишени экспрессируются на поверхности одной и той же клетки. Однако мишени могут находиться по отдельности на разных клетках, при этом связывающие фрагменты для данных связывающих белков выбирают таким образом, чтобы каждый связывающий фрагмент связывал свою мишень с относительно низкой аффинностью (например, при KD в низком микромолярном или высоком наномолярном диапазоне, например, при KD, составляющей более ста наномоль, например, 500, 600, 700, 800 наномоль).

Таким образом, продолжительному связыванию мишени способствуют только ситуации, когда две мишени находятся поблизости на одной и той же клетке.

Можно получить биспецифические связывающие белки, которые содержат два связывающих фрагмента, которые связывают одну и ту же мишень, при этом каждый связывает разный эпитоп на одной и той же мишени. Данная структура особенно подходит для повышения до максимума вероятности успешного блокирования мишени связывающим белком. Одна и та же биспецифическая связывающая молекула может нацеливаться на несколько внеклеточных петель, например, трансмембранного канала или рецептора клеточной поверхности.

Можно получить биспецифические связывающие белки, которые содержат два связывающих фрагмента, которые образуют кластер с отрицательными регуляторами передачи сигнала иммунными клетками и активируют их, что приводит к супрессии иммунного ответа. Репрессии в цис-положении можно достичь, если мишени находятся на одной и той же клетке; репрессии в транс-положении можно достичь, если мишени находятся на разных клетках. Репрессии в цис-положении, например, можно достичь с помощью биспецифического связывающего белка, содержащего связывающий фрагмент антитела IgGRIIb и связывающий фрагмент антитела к FelD1, в результате чего кластер с IgGRIIb образовывается только в присутствии FelD1 с целью подавления иммунного ответа на FelD1. Репрессии в транс-положении, например, можно достичь с помощью биспецифического связывающего белка, содержащего связывающий фрагмент антитела к BTLA, и связывающийся фрагмент, который специфически связывает тканеспецифический антиген, представляющий интерес, в результате чего образование кластера с ингибирующей молекулой BTLA происходит только в выбранной целевой ткани, что потенциально обеспечивает лечение аутоиммунных заболеваний.

Можно получить биспецифические связывающие белки, которые активируют многокомпонентные рецепторы. При такой структуре два связывающих фрагмента, направленных на два компонента рецептора, связываются, обеспечивают поперечную сшивку рецептора и активируют передачу сигнала от рецептора. Этого можно добиться, например, с применением биспецифического связывающего белка со связывающим фрагментом, который связывает IFNAR1, и связывающим фрагментом, который связывает IFNAR2, при этом связывание обеспечивает поперечную сшивку рецептора. Такой биспецифический связывающий белок может обеспечивать альтернативу лечению интерфероном.

Можно получить биспецифические связывающие белки, связывающие фрагменты которых перемещаются через полупроницаемый барьер, например, гематоэнцефалический барьер. При такой структуре один связывающий фрагмент связывает мишень, которая может проходить через конкретный селективный барьер; при этом другой связывающий фрагмент нацеливается на молекулу с терапевтической активностью, где целевая молекула с терапевтической активностью обычно не может пересечь барьер.

Данный тип биспецифического связывающего белка пригоден для доставки терапевтических средств в ткани, которые терапевтическое средство иным образом не достигает. Некоторые примеры включают нацеливание на рецептор rIGR для перемещения терапевтического средства в кишечник или легкое или нацеливание на рецептор трансферрина для перемещения терапевтического средства через гематоэнцефалический барьер.

Можно получить биспецифические связывающие белки, связывающие фрагменты которых перемещаются в конкретные клетки или типы клеток. При такой структуре один связывающий фрагмент нацеливается на белок клеточной поверхности (например, рецептор), который легко интернализуется в клетку. Другой связывающий фрагмент нацеливается на внутриклеточный белок, при этом связывание внутриклеточного белка приводит к терапевтическому эффекту.

Биспецифические связывающие белки, которые связывают рецептор на поверхности фагоцитарной иммунной клетки и молекулу на поверхности инфекционного патогена (например, дрожжей или бактерии), сближают инфекционного патогена с фагоцитарной иммунной клеткой для обеспечения фагоцитоза патогена. Примером такой структуры может являться биспецифическое антитело, которое нацеливается на молекулу CD64 или CD89, а также патоген.

Биспецифические связывающие белки, которые содержат вариабельный участок антитела в качестве одного связывающего фрагмента и фрагмент, отличный от Ig, в качестве второго связывающего фрагмента. Вариабельный участок антитела обеспечивает нацеливание, тогда как фрагмент, отличный от Ig, представляет собой эффектор или токсин, связанный с Fc. Таким образом, лиганд (например, эффектор или токсин) доставляется к мишени, связавшейся с вариабельным участком антитела.

Биспецифические связывающие белки, которые содержат два фрагмента, каждый из которых связан с участком Ig (например, последовательностью Ig, содержащей участок CH2 и CH3) таким образом, что любые два фрагмента белка могут сближаться по отношению друг к другу в пределах Fc. Примеры данной структуры включают "ловушки", например, гомо- или гетеродимерные молекулы-ловушки.

Локусы, обеспечивающие повышенную экспрессию.

Локусы, обеспечивающие повышенную экспрессию, которые подходят для применения в настоящем изобретении, включают, например, локус, который содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся существенной гомологией с SEQ ID NO: 1, описанной в патенте США № 8389239 (также называемый в данном документе "локусом EESYR®" или "локусом 1"), локус, который содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся существенной гомологией с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, описанными в заявке на патент США с регистрационным № 14/919300 (также называемый в данном документе "локусом YARS" или "локусом 2"), и другие локусы, обеспечивающие повышенную экспрессию, и последовательности, документально подтвержденные из уровня техники (например, US 20150167020A1 и патент США № 6800457).

В некоторых вариантах осуществления два локуса, обеспечивающие повышенную экспрессию, которые применяют в настоящем изобретении, выбраны из группы, состоящей из локуса, который содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся существенной гомологией с SEQ ID NO: 1, локуса, который содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся существенной гомологией с SEQ ID NO: 2, и локуса, который содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся существенной гомологией с SEQ ID NO: 3. Данные локусы содержат последовательности, которые не только обеспечивают повышенную экспрессию генов, интегрированных посредством функциональной связи с данными последовательностями (т.е. в пределах данных последовательностей или в непосредственной близости к данным последовательностям), но также характеризуются более высокой эффективностью рекомбинации и улучшенной интеграционной стабильностью по сравнению с другими последовательностями в геноме.

SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 были идентифицированы из клеток CHO. Было обнаружено, что другие виды млекопитающих (такие как, например, люди или мыши) характеризуются ограниченной гомологией в отношении идентифицированного участка, обеспечивающего повышенную экспрессию, однако гомологичные последовательности можно обнаружить в линиях клеток, полученных из других типов тканей *Cricetulus griseus* или других гомологичных видов, и их можно выделить посредством методик, которые хорошо известны из уровня техники. Например, можно выявить другие гомологичные последовательности при помощи межвидовой гибридизации или методик на основе ПЦР. Кроме того, в нуклеотидную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, можно вносить изменения посредством методик сайт-направленного или случайного мутагенеза, которые хорошо известны из уровня техники. Варианты полученной последовательности затем можно тестировать в отношении активности повышения экспрессии. ДНК, которые на по меньшей мере приблизительно 90% идентичны по составу нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, обладающими активностью повышения экспрессии, можно выделять с помощью стандартных экспериментов, и, как предполагается, характеризуются активностью повышения экспрессии.

Сайт интеграции, сайт или положение нуклеотида для вставки одной или более экзогенных нуклеиновых кислот могут находиться в любом положении, которое находится в пределах любой из последовательностей, обеспечивающих повышенную экспрессию (таких как SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID

NO: 3), или рядом с ней. То, обеспечивает ли конкретное местоположение в хромосоме в пределах представляющего интерес локуса или рядом с ним стабильную интеграцию и эффективную транскрипцию интегрированного экзогенного гена, можно определить согласно стандартным процедурам, хорошо известным из уровня техники, например, описанным в патенте США 8389239 и заявке на патент США с регистрационным № 14919300.

Сайты интеграции, рассматриваемые в данном документе, расположены в пределах последовательностей, обеспечивающих повышенную экспрессию, или в непосредственной близости к данным последовательностям, например, на менее приблизительно 1 т.о., 500 пар оснований (п.о.), 250 п.о., 100 п.о., 50 п.о., 25 п.о., 10 п.о. или менее приблизительно 5 п.о. выше (5') или ниже (3') по отношению к местоположению последовательности, обеспечивающей повышенную экспрессию, в хромосомной ДНК. В еще одних вариантах осуществления используемый сайт интеграции расположен на приблизительно 1000, 2500, 5000 или более пар оснований выше (5') или ниже (3') по отношению к местоположению последовательности, обеспечивающей повышенную экспрессию, в хромосомной ДНК.

В данной области техники подразумевается, что крупные участки генома, такие как участки прикрепления к ядерному скелету/матриксу, используются для эффективной репликации и транскрипции хромосомной ДНК. Участок прикрепления к ядерному скелету/матриксу (S/MAR), также называемый участком прикрепления к ядерному скелету (SAR), или матрикс-ассоциированным участком или участком прикрепления к матриксу (MAR), представляет собой участок ДНК генома эукариот, где прикрепляется ядерный матрикс. Без ограничения какой-либо теорией S/MAR обычно картируются в некодирующих участках, отделяют указанный участок транскрипции (например, домен хроматина) от соседних участков, а также предоставляют площадки для транскрипционной машины и/или связывания факторов, которые способствуют транскрипции, такие как сайты распознавания ДНКазы или полимеразы. Были описаны некоторые S/MAR, имеющие длину приблизительно 14-20 т.о. (Klar, et al. 2005, Gene 364:79-89). В связи с этим предполагается, что интеграция генов в локус, обеспечивающий повышенную экспрессию (например, в пределах SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 3 или вблизи них), придает повышенную экспрессию. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева, содержащие экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую биспецифический антигенсвязывающий белок, интегрированную в конкретный сайт в пределах локуса, обеспечивающего повышенную экспрессию, характеризуются высокой удельной продуктивностью. В других вариантах осуществления клетка-хозяин, в которой кодируется биспецифический антигенсвязывающий белок, характеризуется удельной продуктивностью, составляющей по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25 или 30 пикограмм/клетка/день (pcd).

В некоторых вариантах осуществления экзогенную нуклеиновую кислоту интегрируют в сайт в пределах локуса, который содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1. В конкретных вариантах осуществления сайт интеграции находится в пределах нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 1 или в непосредственной близости к ней. В конкретных вариантах осуществления сайт интеграции находится в определенном положении в пределах SEQ ID NO: 1, выбранном из положений, охватывающих нуклеотиды под номером 10-13515; 20-12020; 1020-11020; 2020-10020; 3020-9020; 4020-8020; 5020-7020; 6020-6920; 6120-6820; 6220-6720; 6320-6620; 6420-6520; 6460-6500; 6470-6490 и 6475-6485. В других вариантах осуществления сайт интеграции находится в последовательности, которая выбрана из группы, состоящей из нуклеотидов 5000-7400, 5000-6500, 6400-7400 из SEQ ID NO: 1 и нуклеотидов 6400-6500 из SEQ ID NO: 1. В конкретном варианте осуществления сайт интеграции находится перед, после или в пределах триплета "act", соответствующего нуклеотидам 6471-6473 из SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления экзогенную нуклеиновую кислоту интегрируют в сайт в пределах локуса, который содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3. В конкретных вариантах осуществления сайт интеграции находится в пределах нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 2 или в непосредственной близости к ней. В конкретных вариантах осуществления сайт интеграции находится в пределах нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 3 или в непосредственной близости к ней. В некоторых вариантах осуществления сайт интеграции находится в пределах нуклеотидов 1990-1991, 1991-1992, 1992-1993, 1993-1994, 1995-1996, 1996-1997, 1997-1998, 1999-2000, 2001-2002, 2002-2003, 2003-2004, 2004-2005, 2005-2006, 2006-2007, 2007-2008, 2008-2009, 2009-2010, 2010-2011, 2011-2012, 2012-2013, 2013-2014, 2014-2015, 2015-2016, 2016-2017, 2017-2018, 2018-2019, 2019-2020, 2020-2021 или 2021-2022 из SEQ ID NO: 3. В конкретных вариантах осуществления интеграция происходит на месте или в пределах нуклеотидов 2001-2022 из SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления экзогенную нуклеиновую кислоту вставляют на место или в пределах нуклеотидов 2001-2002 или нуклеотидов 2021-2022 из SEQ ID NO: 3, при этом нуклеотиды 2002-2021 из SEQ ID NO: 3 удаляются в результате вставки.

Сайт-специфическая интеграция в локус, обеспечивающий повышенную экспрессию.

Интеграция одной или более экзогенных нуклеиновых кислот в локус, обеспечивающий повышенную экспрессию, сайт-специфическим образом, т.е. в один конкретный сайт в пределах локуса, обеспечивающего повышенную экспрессию, раскрытого в данном документе, можно достичь несколькими способами, в том числе, например, посредством гомологичной рекомбинации и опосредованного рекомби-

назой обмена кассетами, как описано в уровне техники (см., например, патент США № 8389239 и источники, раскрытые в нем).

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены клетки, которые содержат по меньшей мере две, т.е. две или больше, разные последовательности распознавания для рекомбиназы (RRS) в пределах локуса, обеспечивающего повышенную экспрессию, которые подходят для интеграции последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей одну или более экзогенных нуклеиновых кислот или генов, представляющих интерес. Такие клетки можно получить путем введения экзогенной последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей два или более RRS, в требуемый локус посредством различных способов, в том числе гомологичной рекомбинации, описанной в данном документе ниже и в уровне техники, например, патенте США № 8389239 и источниках, раскрытых в нем.

В конкретных вариантах осуществления предусмотрены клетки, которые содержат более двух разных последовательностей распознавания для рекомбиназы (RRS) в пределах локуса, обеспечивающего повышенную экспрессию, которые подходят для интеграции нескольких экзогенных нуклеиновых кислот. В конкретных вариантах осуществления предусмотрены клетки, которые содержат три разные последовательности распознавания для рекомбиназы (RRS) в пределах локуса, обеспечивающего повышенную экспрессию, которые могут опосредовать интеграцию двух отдельных экзогенных нуклеиновых кислот, например, где 5'-RRS и расположенный в середине RRS в геноме соответствуют 5'-RRS и 3'-RRS, фланкирующим первую экзогенную нуклеиновую кислоту, подлежащую интеграции, и расположенный в середине RRS и 3'-RRS в геноме соответствуют 5'-RRS и 3'-RRS, фланкирующим вторую экзогенную нуклеиновую кислоту, подлежащую интеграции.

Подходящие RRS могут быть выбраны из группы, включающей LoxP, Lox511, Lox5171, Lox2272, Lox2372, Loxm2, Lox-FAS, Lox71, Lox66 и их мутантные формы, при этом для обеспечения опосредованного рекомбиназой обмена кассетами (RMCE) применяют сайт-специфическую рекомбиназу, которая представляет собой рекомбиназу Cre или ее производное. В других примерах подходящий RRS может быть выбран из группы, включающей FRT, F3, F5, мутантную форму FRT с делецией 10 аминокислот, мутантную форму FRT с добавлением 10 аминокислот и их мутантные формы, и в данном случае для обеспечения RMCE применяют сайт-специфическую рекомбиназу, которая представляет собой рекомбиназу Flp или ее производное. В еще одном примере RRS могут быть выбраны из группы, включающей attB, attP и их мутантные формы, и в данном случае для обеспечения RMCE применяют сайт-специфическую рекомбиназу, которая представляет собой интегразу phiC31.

В других вариантах осуществления нативные клетки модифицируют посредством методики гомологичной рекомбинации с интеграцией последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей одну или более экзогенных нуклеиновых кислот, в конкретный сайт в пределах локуса, обеспечивающего повышенную экспрессию.

При гомологичной рекомбинации гомологичные молекулы полинуклеотидов (т.е. гомологичные плечи) выстраиваются и обмениваются частью их последовательностей. Трансген можно вводить во время такого обмена, когда трансген фланкирован гомологичными последовательностями генома. В одном примере сайт распознавания для рекомбиназы можно вводить в геном клетки-хозяина по сайтам интеграции посредством гомологичной рекомбинации. В других примерах последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая одну или более экзогенных нуклеиновых кислот, представляющих интерес, например, одну или более нуклеиновых кислот, каждая из которых кодирует HCF или LCF (такой как вариабельный участок), где нуклеиновая последовательность фланкирована последовательностями, гомологичными последовательностям в целевом локусе ("гомологичные плечи"), вставляется в геном хозяина.

Гомологичной рекомбинации в эукариотических клетках можно содействовать путем введения разрыва в хромосомную ДНК по сайту интеграции. Это можно осуществлять путем нацеливания определенных нуклеаз на конкретный сайт интеграции. ДНК-связывающие белки, которые распознают последовательности ДНК в целевом локусе, известны из уровня техники. Векторы, направленные на ген, также используют для облегчения гомологичной рекомбинации.

Конструирование вектора, нацеливающегося на ген, и выбор нуклеазы для обеспечения гомологичной рекомбинации находятся в пределах компетенции специалиста в данной области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. В некоторых примерах нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN), которые характеризуются модулярной структурой и содержат отдельные домены с цинковыми пальцами, распознают конкретную 3-нуклеотидную последовательность в последовательности-мишени (например, в сайте направленной интеграции). В некоторых вариантах осуществления можно использовать ZFN в комбинации с отдельными доменами с цинковыми пальцами, нацеленными на множество последовательностей-мишеней. Нуклеазы на основе подобного активатору транскрипции (TAL) эффектора (TALEN) также можно использовать для сайт-специфического редактирования генома. ДНК-связывающий домен белка TAL-эффектора, как правило, используют в комбинации с неспецифическим доменом расщепления нуклеазы рестрикции, такой как FokI. В некоторых вариантах осуществления белок слияния, содержащий ДНК-связывающий домен белка TAL-эффектора и домен расщепления нуклеазы рестрикции, используют для распознавания и расщепления ДНК в локусе последовательности-

мишени по настоящему изобретению (Boch J et al., 2009 Science 326:1509-1512). РНК-управляемые эндонуклеазы (RGEN) представляют собой программируемые инструменты для геномной инженерии, которые разработаны на основе механизма бактериального адаптивного иммунитета. В данной системе короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами, (CRISPR)/CRISPR-ассоциированный (Cas) иммунный ответ, представляют собой белок Cas9, который формирует эндонуклеазу, специфическую к определенной последовательности при образовании комплекса с двумя РНК, одна из которых направлена на выбор мишени. RGEN включают компоненты (Cas9 и tracrRNA) и направленные CRISPR РНК (crRNA). Как эффективность расщепления ДНК-мишени, так и местоположение сайтов расщепления меняются в зависимости от положения мотива, смежного с протоспейсером (PAM), дополнительно необходимого для распознавания мишени (Chen, H. et al, J. Biol. Chem., опубликованная онлайн 14 марта 2014 г. в виде оригинала MI 13.539726). Последовательности, уникальные для конкретного нацеливаемого локуса (такие как SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3), можно идентифицировать посредством выравнивания многих из данных последовательностей по отношению к геному CHO, за счет чего можно выявить потенциальные нецелевые сайты с совпадением в 16-17 пар оснований.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающий вектор, несущий нуклеиновую кислоту, представляющую интерес (например, нуклеиновую кислоту, содержащую один или более RRS, необязательно фланкирующих один или более генов селективируемого маркера, или нуклеиновую кислоту, содержащую одну или более экзогенных нуклеиновых кислот, каждая из которых кодирует HCF или LCF (такой как вариабельный участок), фланкированных 5'- и 3'-концевыми гомологичными плечами), вводят в клетку с одним или более дополнительными векторами или мРНК. В одном варианте осуществления один или более дополнительных векторов или мРНК содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую сайт-специфическую нуклеазу, в том числе без ограничений нуклеазу с цинковыми пальцами (ZFN), ZFN в виде димера, нуклеазу на основе подобного активатору транскрипции эффектора (TALEN), слитый белок на основе домена TAL-эффектора или РНК-управляемую ДНК-эндонуклеазу. В определенных вариантах осуществления один или более векторов или мРНК предусматривают первый вектор, содержащий направляющую РНК, tracrRNA и нуклеотидную последовательность, кодирующую фермент Cas, и второй вектор, содержащий донорную (экзогенную) нуклеотидную последовательность. Такая донорная последовательность содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую ген, представляющий интерес, или последовательность распознавания, или генную кассету, содержащую любой из этих экзогенных элементов, предусмотренных для нацеленной вставки. Если используется мРНК, то мРНК можно трансфицировать в клетку при помощи обычных способов трансфекции, известных специалистам в данной области техники, и она может кодировать фермент, например, транспозазу или эндонуклеазу. Несмотря на то, что мРНК, вводимая в клетки, может быть временной и не интегрируется в геном, мРНК может нести экзогенную нуклеиновую кислоту, необходимую или эффективную для осуществления интеграции. В некоторых примерах мРНК выбирают с целью устранения любого риска длительных побочных эффектов от вспомогательного полинуклеотида, если требуется лишь кратковременная экспрессия для достижения требуемой интеграции нуклеиновой кислоты.

Векторы для сайт-специфической интеграции.

В данном документе предусмотрены векторы на основе нуклеиновой кислоты для введения экзогенных нуклеиновых кислот в два локуса, обеспечивающих повышенную экспрессию, посредством сайт-специфической интеграции. Подходящие векторы включают векторы, сконструированные так, чтобы содержать экзогенную нуклеиновую последовательность, фланкированную RRS, для интеграции посредством RMCE, и векторы, сконструированные так, чтобы содержать экзогенную нуклеиновую последовательность, представляющую интерес, фланкированную гомологичными плечами, для интеграции посредством гомологичной рекомбинации.

В различных вариантах осуществления предусмотрены векторы для обеспечения сайт-специфической интеграции посредством RMCE. В некоторых вариантах осуществления векторы сконструированы так, чтобы обеспечивать одновременную интеграцию нескольких нуклеиновых кислот в два целевых локуса. В отличие от последовательной интеграции одновременная интеграция обеспечивает возможность эффективного и быстрого выделения требуемых клонов, которые продуцируют антигенсвязывающие белки или другие мультимерные белки, представляющие интерес, которые подходят для крупномасштабного производства (изготовления).

В некоторых вариантах осуществления предусмотрен набор векторов для экспрессии биспецифического антигенсвязывающего белка в клетке.

В некоторых вариантах осуществления набор векторов может включать два "вектора HCF", каждый из которых содержит нуклеиновую кислоту, фланкированную 5'-RRS и 3'-RRS, где нуклеиновая кислота включает нуклеотидную последовательность, кодирующую HCF, и где два HCF отличаются. RRS в двух векторах HCF отличаются друг от друга и сконструированы так, чтобы обеспечивать интеграцию нуклеотидных последовательностей, кодирующих HCF, в два локуса, обеспечивающие повышенную экспрессию. Набор векторов также включает нуклеотидную последовательность, кодирующую LCF, которая может быть включена в один из векторов HCF или в оба вектора HCF (за счет чего обеспечиваются

две копии одного и того же LCF), или в качестве альтернативы она может быть предусмотрена в отдельном "векторе LCF" и фланкироваться 5'-RRS и 3'-RRS.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая LCF, включена в один из векторов HCF и размещена между 5'-RRS и 3'-RRS в таком векторе HCF. Последовательность, кодирующая LCF, может быть помещена выше или ниже последовательности, кодирующей HCF.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая LCF, включена в оба вектора HCF и размещена между 5'-RRS и 3'-RRS в каждом векторе HCF. Аналогичным образом последовательность, кодирующая LCF, может быть помещена выше или ниже последовательности, кодирующей HCF, в каждом векторе.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая LCF, предусмотрена в отдельном векторе, векторе "LCF", и фланкирована 5'-RRS и 3'-RRS, при этом два RRS отличаются друг от друга. RRS в наборе векторов могут быть сконструированы таким образом, чтобы последовательность, кодирующая LCF, могла "соединиться" с одной из последовательностей, кодирующих HCF, посредством общего RRS в ходе RMCE с целевым локусом, который также содержит общий RRS. Например, 3'-RRS из вектора LCF может быть одинаковым по сравнению с 5'-RRS из одного из векторов HCF, что приводит к конфигурации LCF-HCF после интеграции в целевой локус посредством RMCE. В другом примере 3'-RRS из вектора HCF может быть одинаковым по сравнению с 5'-RRS из вектора LCF, что приводит к конфигурации HCF-LCF после интеграции в целевой локус посредством RMCE. В некоторых вариантах осуществления общий RRS сконструирован в формате с расщепленным селективируемым маркером - то есть он включен с 3'-конца 5'-части гена селективируемого маркера, включенного в один вектор, а также включен с 5'-конца оставшейся 3'-части одного и того же гена селективируемого маркера, включенного в другой вектор - таким образом, что при "соединении" и интеграции в целевой локус надлежащим образом интегрированная нуклеиновая кислота включает целый ген селективируемого маркера для обеспечения возможности подходящей идентификации трансфектантов. В некоторых вариантах осуществления общий RRS сконструирован в формате с расщепленным геном, т.е. включен с 3'-конца 5'-части гена или интрона такого расщепленного гена в качестве составной части 5'-части указанного гена в одном векторе, и с 5'-конца оставшейся части гена или интрона такого расщепленного гена в качестве составной части оставшейся 3'-части указанного расщепленного гена. В еще одних вариантах осуществления третий или расположенный в середине RRS в первом векторе сконструирован так, чтобы находиться между промотором и геном селективируемого маркера, с которым он функционально связан (но отделен от него в другом векторе); при этом третий или расположенный в середине RRS в первом векторе сконструирован так, чтобы находиться с 3'-конца промотора; и третий или расположенный в середине RRS во втором векторе сконструирован так, чтобы находиться с 5'-конца гена селективируемого маркера.

В некоторых вариантах осуществления набор векторов может включать дополнительную нуклеотидную последовательность, кодирующую LCF. То есть набор векторов может включать два вектора HCF и две нуклеотидные последовательности, кодирующие LCF. Две последовательности, кодирующие LCF, могут кодировать одинаковый или разный LCF. В некоторых вариантах осуществления каждая из двух последовательностей, кодирующих LCF, может быть включена в вектор HCF, что приводит к получению двух векторов, каждый из которых содержит последовательность, кодирующую HCF, и последовательность, кодирующую LCF. Два вектора могут быть сконструированы так, чтобы содержать RRS, подходящие для нацеливания последовательностей в двух векторах на два локуса. В других вариантах осуществления одна из двух последовательностей, кодирующих LCF, включена в вектор HCF и размещена между 5'-RRS и 3'-RRS в таком векторе HCF, а другая последовательность, кодирующая LCF, предусмотрена в отдельном векторе, то есть одном векторе, содержащем как LCF, так и HC (в конфигурации LCF-HCF или HCF-LCF, или вкратце "вектор LCF/HCF"), одном векторе HCF и одном векторе LCF. В некоторых из данных других вариантов осуществления RRS в векторах могут быть сконструированы так, чтобы обеспечить возможность соединения последовательности, кодирующей HCF, из вектора HCF и последовательности, кодирующей LCF, из вектора LCF в целевом локусе посредством RMCE. Например, 3'-RRS из вектора LCF могут быть одинаковыми 5'-RRS из вектора HCF, и общий RRS может быть сконструирован в формате с расщепленным селективируемым маркером или расщепленным интроном для облегчения селекции и идентификации трансфектантов. В еще одних вариантах осуществления, где два LCF отличаются, каждая из двух нуклеотидных последовательностей, кодирующих LCF, могут быть предусмотрены в отдельном векторе, то есть набор векторов включает два вектора HCF и два вектора LCF. RRS могут быть сконструированы так, чтобы обеспечить возможность надлежащего "соединения" одной последовательности, кодирующей LCF, с одной последовательностью, кодирующей HCF, в одном целевом локусе, и другой последовательности, кодирующей LCF, с другой последовательностью, кодирующей HCF, во втором целевом локусе. На фиг. 1, 3 и 4 проиллюстрированы разные форматы векторов и комбинации RRS/локусов, и их не следует подразумевать как ограничивающие. Каждая указанная система векторов обеспечивает средства для одновременной интеграции каждой нуклеотидной последовательности в присутствии рекомбиназы для быстрого и подходящего выбора положительных интегрантов (требуемых клонов).

Нуклеотидные последовательности, кодирующие HCF или LCF, могут кодировать аминокислоты

или домен(домены) константного участка или кодировать целый константный участок. В конкретных вариантах осуществления нуклеотидные последовательности, кодирующие HCF или LCF, могут кодировать один или более константных доменов, таких как CL, CH1, шарнир, CH2, CH3 или их комбинации. В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая домен HCF, может кодировать домен CH3. Например, нуклеотидная последовательность, кодирующая первый HCF, может кодировать первый домен CH3, а нуклеотидная последовательность, кодирующая второй HCF, может кодировать второй домен CH3. Первый и второй домены CH3 могут быть одинаковыми или отличаться на по меньшей мере одну аминокислоту. Отличия в доменах CH3 или в константных участках могут принимать любой из форматов биспецифических антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе, например, отличия, которые приводят к различным характеристикам связывания с белком А или к формату "выступ-и-впадина". Независимо от любых отличий в аминокислотной последовательности две нуклеотидные последовательности, кодирующие HCF, также могут отличаться тем, что одна из двух нуклеотидных последовательностей была модифицирована по кодонам.

В некоторых вариантах осуществления каждая нуклеотидная последовательность, кодирующая HCF или LCF, независимо и функционально связана с последовательностью, регулирующей транскрипцию, которая включает, например, промотор. В некоторых вариантах осуществления промоторы, управляющие транскрипцией двух полипептидов, содержащих HCF, являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления все из промоторов, управляющих транскрипцией двух полипептидов, содержащих HCF, а также промотора, управляющего транскрипцией полипептида, содержащего LCF, являются одинаковыми (например, промотор CMV или любой другой подходящий промотор, описанный в данном документе). В некоторых вариантах осуществления каждая нуклеотидная последовательность, кодирующая HCF или LCF, независимо и функционально связана с индуцируемым или репрессируемым промотором. Индуцируемые или репрессируемые промоторы обеспечивают возможность того, чтобы продуцирование происходило, например, только в фазе продуцирования (культура с подпиткой), а не в фазе роста (культура, выращиваемая в системе посевных ферментеров). Индуцируемые или репрессируемые промоторы также обеспечивают возможность дифференциальной экспрессии одного или более генов, представляющих интерес. В некоторых вариантах осуществления каждая нуклеотидная последовательность, кодирующая HCF и/или LCF, независимо и функционально связана с промотором, расположенным выше по меньшей мере одного оператора TetR (TetO) или оператора Arc (ArcO). В еще одних вариантах осуществления каждая нуклеотидная последовательность, кодирующая HCF и/или LCF, независимо и функционально связана с гибридным промотором CMV/TetO или CMV/ArcO. Примеры гибридных промоторов (также называемых регуляторными слитыми белками) можно найти в международной публикации № WO03101189A1, опубликованной 11 декабря 2003 года (включенной в данный документ посредством ссылки).

В некоторых вариантах осуществления набор векторов включает нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбиназу, которая распознает один или более RRS, которые могут быть включены в один из векторов, кодирующих HCF или LCF, или предусмотрены в отдельном векторе.

В различных других вариантах осуществления предусмотрены векторы для обеспечения сайт-специфической интеграции посредством гомологичной рекомбинации.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрен набор векторов, который включает два вектора, каждый из которых содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, фланкированную 5'-концевым гомологичным плечом и 3'-концевым гомологичным плечом, для сайт-специфической интеграции в два локуса, обеспечивающих повышенную экспрессию, в клетке, где экзогенные нуклеиновые кислоты из двух векторов вместе кодируют антигенсвязывающий белок. Таким образом, гомологичные плечи в одном векторе сконструированы так, чтобы обеспечивать интеграцию в один из двух локусов, и гомологичные плечи в другом векторе сконструированы так, чтобы обеспечивать интеграцию в другой локус. В данных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок может являться моноспецифическим или биспецифическим.

Выбор последовательностей, гомологичных последовательностям в пределах локуса, обеспечивающего повышенную экспрессию, и включение выбранных последовательностей в качестве гомологичных плеч в нацеливающийся вектор находятся в пределах компетенции специалиста в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления вектор или конструкция содержат первое гомологичное плечо и второе гомологичное плечо, где первое и второе гомологичные плечи совместно содержат целевую последовательность, которая замещает эндогенную последовательность в пределах локуса. В других вариантах осуществления первое и второе гомологичные плечи содержат целевую последовательность, которая интегрируется или вставляется в пределах эндогенной последовательности в локусе. В некоторых вариантах осуществления гомологичные плечи содержат нуклеотидную последовательность, гомологичную нуклеотидной последовательности, присутствующей в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3. В конкретных вариантах осуществления вектор содержит 5'-концевое гомологичное плечо, содержащее нуклеотидную последовательность, соответствующую нуклеотидам 1001-2001 из SEQ ID NO: 3, и 3'-концевое гомологичное плечо, содержащее нуклеотид, соответствующий нуклеотидам 2022-3022 из SEQ ID NO: 3. Гомологичные плечи, например, первое гомологичное плечо (также называемое

5'-концевым гомологичным плечом) и второе гомологичное плечо (также называемое 3'-концевым гомологичным плечом), являются гомологичными целевой последовательности в локусе. Гомологичные плечи в направлении от 5'-конца к 3'-концу могут охватывать участок или целевую последовательность в локусе, которые содержат по меньшей мере 1 т.о., или по меньшей мере приблизительно 2 т.о., или по меньшей мере приблизительно 3 т.о., или по меньшей мере приблизительно 4 т.о., или по меньшей мере 5 т.о., или по меньшей мере приблизительно 10 т.о. В других вариантах осуществления общее число нуклеотидов в целевой последовательности, выбранной для первого и второго гомологичных плеч, составляет по меньшей мере 1 т.о., или по меньшей мере приблизительно 2 т.о., или по меньшей мере приблизительно 3 т.о., или по меньшей мере приблизительно 4 т.о., или по меньшей мере 5 т.о., или по меньшей мере приблизительно 10 т.о. В некоторых примерах расстояние между 5'-концевым гомологичным плечом и 3'-концевым гомологичным плечом (гомологичными целевой последовательности) составляет по меньшей мере 5 п.о., 10 п.о., 20 п.о., 30 п.о., 40 п.о., 50 п.о., 60 п.о., 70 п.о., 80 п.о., 90 п.о., 100 п.о., 200 п.о., 300 п.о., 400 п.о., 500 п.о., 600 п.о., 700 п.о., 800 п.о., 900 п.о. или по меньшей мере 1 т.о., или по меньшей мере приблизительно 2 т.о., или по меньшей мере приблизительно 3 т.о., или по меньшей мере приблизительно 4 т.о., или по меньшей мере 5 т.о., или по меньшей мере приблизительно 10 т.о. В случаях, где нуклеотиды 1001-2001 и 2022-3022 из SEQ ID NO: 3 выбраны в качестве 5'- и 3'-гомологичных плеч, расстояние между двумя гомологичными плечами может составлять 20 нуклеотидов (соответствующих нуклеотидам 2002-2021 из SEQ ID NO: 3); и такие гомологичные плечи могут опосредовать интеграцию экзогенной последовательности нуклеиновой кислоты в локус, содержащий SEQ ID NO: 3, например, в пределах нуклеотидов 1990-2021 или 2002-2021 из SEQ ID NO: 3, и одновременно делению нуклеотидов 2002-2021 из SEQ ID NO: 3.

Раскрытые в данном документе векторы для введения экзогенных нуклеиновых кислот с целью сайт-специфической интеграции в локус, обеспечивающий повышенную экспрессию, могут включать дополнительные гены и последовательности для управления экспрессией экзогенных нуклеиновых кислот, представляющих интерес и кодирующих полипептиды, и для обеспечения селекции и идентификации клеток, в которые экзогенные нуклеиновые кислоты, представляющие интерес, успешно интегрировались. Такие дополнительные последовательности включают, например, последовательности, регулирующие транскрипцию и трансляцию, гены селектируемого маркера и т.п., которые также описаны в данном документе ниже.

Регуляторные последовательности.

Раскрытые в данном документе векторы для введения экзогенных нуклеиновых кислот в локус, обеспечивающий повышенную экспрессию, сайт-специфическим образом и клетки, полученные в результате сайт-специфической интеграции, могут включать регуляторные последовательности для управления экспрессией экзогенных нуклеиновых кислот, представляющих интерес, и кодируемых полипептидов. Регуляторные последовательности включают транскрипционные промоторы, энхансеры, последовательности, кодирующие подходящие сайты связывания рибосом на мРНК, и последовательности, которые контролируют терминацию транскрипции и трансляции. Из вирусных источников можно получить последовательности, контролирующие транскрипцию и трансляцию. Например, широко применяемые промоторы и энхансеры, полученные из вирусов, таких как вирус полиомы, аденовирус 2, вирус обезьян 40 (SV40), цитомегаловирус (CMV) мыши или человека, представляют собой промотор предранних генов CMV (CMV-IE) или промотор основного IE CMV (CMV-MIE), а также RSV, промотор поздних генов SV40, SL3-3, MMTV, промотор гена убиквитина (Ubi), промотор гена убиквитина C (UbC) и промоторы LTR ВИЧ. Промоторы, контролирующие и/или сигнальные последовательности из генома вирусов можно использовать для управления экспрессией при условии, что такие контролирующие последовательности являются совместимыми с выбранной клеткой-хозяином. В зависимости от типа клетки, в которой белки, представляющие интерес, должны экспрессироваться, можно также применять отличные от вирусных клеточные промоторы (например, промоторы гена β -глобина и EF-1aaa). Последовательности ДНК, полученные из генома вируса SV40, например, точку начала репликации, промотор ранних и поздних генов, энхансер, сайты сплайсинга и полиаденилирования SV40 можно применять для обеспечения других генетических элементов, пригодных для экспрессии экзогенной последовательности ДНК. Промоторы ранних и поздних генов особенно пригодны в связи с тем, что их обоих легко получают из вируса SV40 в виде фрагмента, который также содержит точку начала репликации вируса SV40 (Fiers et al., Nature 273:113, 1978). Можно также применять более мелкие или более крупные фрагменты SV40. Обычно включают последовательность из примерно 250 п.о., которая простирается от сайта Hind III до сайта BglI, расположенного в точке начала репликации SV40. Можно применять индуцируемые (например, индуцируемые химическим соединением, кофактором, регуляторным белком) и/или репрессируемые (например, репрессируемые химическим соединением, кофактором, регуляторным белком) промоторы, и они особенно пригодны для обеспечения возможности того, чтобы продуцирование антигенсвязывающих белков происходило только в фазе продуцирования (культура с подпиткой), а не в ходе фазы роста (культура, выращиваемая в системе посевных ферментеров), или с точностью контролировать дифференциальную экспрессию компонентов антитела в разных локусах. Примеры индуцируемых промоторов включают промоторы гена алкогольдегидрогеназы I, тетрациклин-чувствительные промоторные

системы, промоторы генов глюкокортикоидного рецептора, промотор гена эстрогенового рецептора, промоторы гена рецептора экидизона, промоторы на основе гена металлотионеина и промоторы на основе гена T7-полимеразы. Примеры репрессируемых промоторов включают гибридные промоторы (также называемые регуляторными слитыми белками), содержащие CMV или другой промотор, функционально связанный с по меньшей мере одним оператором TetR (TetO) или оператором Arc (ArcO), и описаны в международной публикации № WO03101189A1, опубликованной 11 декабря 2003 г. (включенной в данный документ посредством ссылки). Последовательности, подходящие для экспрессии нескольких транскриптов посредством бицистронного вектора, были описаны ранее (Kim S. K. and Wold B. J., *Cell* 42:129, 1985), и их можно применять в настоящем изобретении. Примеры подходящих стратегий мультицистронной экспрессии белков включают применение пептида 2A (Szymczak et al., *Expert Opin Biol Ther* 5: 627-638 (2005)) и применение сайта внутренней посадки рибосомы ("IRES"), обе из которых хорошо известны из уровня техники. Другие типы векторов экспрессии будут также пригодны, например, описанные в патенте США №4634665 (Axel et al.) и патенте США №4656134 (Ringold et al.).

Селектируемые маркеры.

Раскрытые в данном документе векторы для введения экзогенных нуклеиновых кислот в locus, обеспечивающий повышенную экспрессию, сайт-специфическим образом и клетки, полученные в результате сайт-специфической интеграции, могут включать один или более генов селектируемых маркеров.

В некоторых вариантах осуществления ген селектируемого маркера придает устойчивость к лекарственному средству, как, например, таковые, описанные в табл. 1 Kaufman, R. J. (1988) *Meth. Enzymology* 185:537, и предусматривают устойчивость к DHFR-MTX, P-гликопротеину и различным липофильным цитотоксическим средствам с множественной устойчивостью к лекарственным средствам (например, адриамицину, колхицину, винкристину) и аденозиндеаминазу (ADA)-Xyl-A или аденозину и 2'-дезоксикоформинцину. Другие доминантные селектируемые маркеры включают выделенные из микроорганизмов гены устойчивости к антибиотикам, например, устойчивости к неомицину, канамицину или гигромицину. Существует несколько подходящих систем для отбора клеток млекопитающих (Sambrook, выше, с. 16.9-16.15). Также были описаны протоколы котрансфекции, в которых используют два доминантных селектируемых маркера (Okayama and Berg, *Mol. Cell Biol* 5:1136, 1985).

В других вариантах осуществления ген селектируемого маркера кодирует полипептид, который обеспечивает или способен генерировать выявляемый сигнал для распознавания генных кассет, которые были успешно вставлены и/или заменены или не были успешно вставлены и/или заменены, в зависимости от конкретного случая. Подходящие примеры включают среди прочего флуоресцентный маркер или белок, фермент, который катализирует химическую реакцию, которая генерирует выявляемый сигнал. Примеры флуоресцентных маркеров хорошо известны из уровня техники, включая без ограничений флуоресцентный красный белок, выделенный из *Discosoma* (DsRed), зеленый флуоресцентный белок (GFP), усиленный зеленый флуоресцентный белок (eGFP), голубой флуоресцентный белок (CFP), усиленный голубой флуоресцентный белок (eCFP), желтый флуоресцентный белок (YFP), усиленный желтый флуоресцентный белок (eYFP) и флуоресцентный белок дальнего красного спектра (например, mKate, mKate2, mPlum, mRaspberry или E2-crimson). См. также, например, Nagai, T., et al. 2002 *Nature Biotechnology* 20:87-90; Heim, R. et al. 23 February 1995 *Nature* 373:663-664 и Strack, R.L. et al. 2009 *Biochemistry* 48:8279-81.

Системы для получения антигенсвязывающих белков.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает системы, которые включают комбинацию клетки (например, клетки CHO) с одним или более векторами и которые можно использовать для получения клеток, характеризующихся интегрированными в два локуса, обеспечивающих повышенную экспрессию, экзогенными нуклеиновыми кислотами, которые вместе кодируют антигенсвязывающий белок, или моноспецифический белок, или биспецифический белок. Системы могут быть предусмотрены в виде набора, например.

В некоторых вариантах осуществления система разработана так, чтобы обеспечить эффективное конструирование вектора и одновременную интеграцию нескольких экзогенных нуклеиновых кислот посредством RMCE в конкретные сайты в двух локусах, обеспечивающих повышенную экспрессию. Одновременная интеграция обеспечивает быстрое выделение требуемых клонов, а использование двух локусов, обеспечивающих повышенную экспрессию, также является важным для создания стабильной линии клеток, подходящей для получения белков (например, коммерчески доступной линии клеток).

Система, предусмотренная в данном документе, включает клетку и набор векторов. Клетка содержит пару RRS (5'-RRS и 3'-RRS), интегрированных в каждый из двух локусов, обеспечивающих повышенную экспрессию. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота находится между 5'-RRS и 3'-RRS в каждом локусе и может включать, например, один или более селектируемых маркерных генов. Набор векторов включает по меньшей мере два вектора, где каждый вектор содержит пару RRS (5'-RRS и 3'-RRS), фланкирующих нуклеотидную последовательность, кодирующую HCF или LCF, и где нуклеотидная последовательность в одном из двух векторов кодирует HCF (вектор HCF), и где нуклеотидная последовательность в другом из двух векторов кодирует LCF (вектор LCF), и где HCF и LCF представляют собой участки антигенсвязывающего белка. 5'-RRS и 3'-RRS в каждой паре RRS

отличаются, и RRS в системе сконструированы таким образом, что при введении векторов в клетку нуклеотидные последовательности, кодирующие HCF или LCF в векторах, интегрируются в два локуса, обеспечивающих повышенную экспрессию, посредством RMCE, опосредованного RRS, для экспрессии антигенсвязывающего белка. В зависимости от антигенсвязывающего белка, количества векторов, расположения последовательностей, кодирующих HCF или LCF, и взаимосвязи между RRS, систему можно разрабатывать разными путями.

В некоторых вариантах осуществления система разработана для интеграции в два локуса, обеспечивающих повышенную экспрессию, и экспрессии моноспецифических антигенсвязывающих белков. В некоторых вариантах осуществления 5'-RRS и 3'-RRS в одном из двух векторов (например, векторе HCF и векторе LCF) являются идентичными 5'-RRS и 3'-RRS в одном или двух локусах соответственно, и 5'-RRS и 3'-RRS в другом векторе являются идентичными 5'-RRS и 3'-RRS в другом локусе соответственно, фактически целенаправленно воздействуя на нуклеиновые кислоты HCF и LCF по-отдельности в отношении каждого из двух локусов. В других вариантах осуществления последовательность, кодирующая HCF, и последовательность, кодирующая LCF, несмотря на их нахождение в отдельных векторах, сконструированы для интеграции совместно в каждый из двух локусов. Согласно данным вариантам осуществления 5'-RRS и 3'-RRS в первом локусе являются одинаковыми 5'-RRS и 3'-RRS во втором локусе соответственно; и каждый локус также содержит дополнительный RRS между 5'- и 3'-RRS ("расположенный в середине RRS"). Кроме того, 5'-RRS в первом из двух векторов является одинаковым по сравнению с 5'-RRS в первом и втором локусах, 3'-RRS в данном первом векторе является одинаковым по сравнению с 5'-RRS во втором векторе и расположенным в середине RRS в первом и втором локусах, и 3'-RRS во втором векторе является одинаковым по сравнению с 3'-RRS в обоих локусах. Векторы могут быть сконструированы так, чтобы содержать промотор и селективируемый маркер в расщепленном формате (промотор в одном векторе и селективируемый маркер, с которым функционально связан промотор, в другом векторе). Векторы могут быть сконструированы так, чтобы содержать селективируемый маркер в расщепленном формате или интрон в расщепленном формате, как описано выше, для облегчения селекции трансфектантов с правильной интеграцией. Кроме того, систему можно разрабатывать таким образом, чтобы обеспечить различное взаимное расположение последовательности, кодирующей LCF, и последовательности, кодирующей HCF, после интеграции. В некоторых вариантах осуществления систему разрабатывают таким образом, чтобы последовательность, кодирующая LCF, интегрировалась выше последовательности, кодирующей HCF. В других вариантах осуществления систему разрабатывают таким образом, чтобы последовательность, кодирующая LCF, интегрировалась выше последовательности, кодирующей HCF.

В некоторых вариантах осуществления система разработана для интеграции в два локуса, обеспечивающих повышенную экспрессию, и экспрессии биспецифических антигенсвязывающих белков.

В некоторых вариантах осуществления в дополнение к вектору HCF (кодирующему первый HCF) и вектору LCF (кодирующему первый LCF) система также включает нуклеотидную последовательность, кодирующую второй HCF, который отличается от первого HCF. Нуклеотидная последовательность, кодирующая второй HCF, может быть включена, например, в вектор LCF или в отдельный вектор, например, второй вектор HCF. В некоторых вариантах осуществления вторая последовательность, кодирующая HCF, включена в вектор LCF между 5'-RRS и 3'-RRS в векторе LCF, в случае чего система включает вектор HCF и вектор LCF/HCF. Систему, в частности RRS, можно разрабатывать так, чтобы интегрировать последовательность, кодирующую HCF, в один из двух локусов и последовательность, кодирующую как HCF, так и LCF, в другой локус. В других вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая второй HCF, находящаяся в отдельном векторе, фланкирована 5'-RRS и 3'-RRS, в случае чего система включает два вектора HCF и один вектор LCF. В данных других вариантах осуществления RRS в системе могут быть сконструированы таким образом, что последовательность, кодирующая LCF, способна "соединяться" посредством RMCE с одной из последовательностей, кодирующих HCF, посредством общего RRS, который также присутствует в одном или двух локусах между 5'-RRS и 3'-RRS в данном локусе, и другая последовательность, кодирующая HCF, будет интегрироваться в другой из двух локусов. Например, 3'-RRS из вектора LCF может быть одинаковым по сравнению с 5'-RRS одного из векторов HCF и также расположенным в середине RRS в одном из двух локусов - данная конструкция приводит к конфигурации LCF-HCF после интеграции в локус, содержащий расположенный в середине RRS. В другом примере 3'-RRS из вектора HCF может быть одинаковым по сравнению с 5'-RRS из вектора LCF и расположенным в середине RRS в одном из двух локусов, что приводит к конфигурации HCF-LCF после интеграции в локус, содержащий расположенный в середине RRS. В некоторых вариантах осуществления общий RRS сконструирован в формате расщепленного селективируемого маркера или формате расщепленного интрона, как описано в данном документе выше.

В некоторых вариантах осуществления система также включает нуклеотидную последовательность, кодирующую второй LCF, в дополнение к вектору HCF (кодирующему первый HCF) и вектору LCF (кодирующему первый LCF), и нуклеотидную последовательность, кодирующую второй HCF, который отличается от первого HCF. То есть система включает четыре отдельных кодирующих последовательности, две, кодирующие HCF, и две, кодирующие LCF. Два LCF могут быть одинаковыми или отличающимися.

Четыре кодирующие последовательности могут быть помещены в векторы в различных вариантах конструкции. В некоторых вариантах осуществления четыре последовательности помещены в два вектора: LCF/HCF и LCF/HCF с LCF, расположенным либо выше, либо ниже HCF в любом из векторов. Систему (RRS) можно разрабатывать таким образом, что одна последовательность вектора интегрируется в один локус, а другая последовательность вектора интегрируется в другой локус. В некоторых вариантах осуществления четыре последовательности помещены в три вектора: LCF, HCF и LCF/HCF (с LCF, расположенным либо выше, либо ниже HCF). RRS в системе можно конструировать таким образом, что последовательности в векторе LCF/HCF интегрируются в один локус, а последовательность, кодирующая LCF, в векторе LCF и последовательность, кодирующая HCF, в векторе HCF интегрируются в другой локус при помощи общего RRS, разделяемого вектором LCF, вектором HCF и данным другим локусом. Аналогичным образом общий RRS можно разрабатывать в формате расщепленного маркера или расщепленного интрона. В некоторых вариантах осуществления четыре последовательности помещены в четыре вектора: LCF, HCF, LCF и HCF. RRS в системе можно конструировать таким образом, что последовательность, кодирующая LCF, в одном из векторов LCF и последовательность, кодирующая HCF, в одном из векторов HCF интегрируются совместно в один локус при помощи общего RRS, а последовательность, кодирующая LCF, в другом из векторов LCF и последовательность, кодирующая HCF, в другом из векторов HCF интегрируются совместно в один локус при помощи общего RRS.

В различных вариантах осуществления предусмотренной в данном документе системы нуклеотидные последовательности, кодирующие HCF или LCF, могут кодировать аминокислоты, например, аминокислоты или домен(домены) константного участка или кодировать целый константный участок. В конкретных вариантах осуществления нуклеотидные последовательности, кодирующие HCF или LCF, могут кодировать один или более константных доменов, таких как CL, CH1, CH2, CH3 или их комбинации. В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая домен HCF, может кодировать домен CH3. Например, нуклеотидная последовательность, кодирующая первый HCF, может кодировать первый домен CH3, а нуклеотидная последовательность, кодирующая второй HCF, может кодировать второй домен CH3. Первый и второй домены CH3 могут быть одинаковыми или отличаться на по меньшей мере одну аминокислоту. Отличия в доменах CH3 или в константных участках могут принимать любой из форматов биспецифических антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе, например, отличия, которые приводят к различным характеристикам связывания с белком А или к формату "выступ-и-впадина". Независимо от любых отличий в аминокислотной последовательности две нуклеотидные последовательности, кодирующие HCF, также могут отличаться тем, что одна из двух нуклеотидных последовательностей была модифицирована по кодонам.

В различных вариантах осуществления предусмотренной в данном документе системы каждая нуклеотидная последовательность, кодирующая HCF или LCF, независимо и функционально связана с последовательностью, регулирующей транскрипцию, которая включает, например, промотор. В некоторых вариантах осуществления промоторы, управляющие транскрипцией двух полипептидов, содержащих HCF, являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления все из промоторов, управляющих транскрипцией двух полипептидов, содержащих HCF, являются одинаковыми (например, промотор CMV, индуцируемый промотор, репресслируемый промотор или любой другой подходящий промотор, описанный в данном документе).

В некоторых вариантах осуществления настоящая система дополнительно включает нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбиназу, которая распознает один или более RRS, которые могут быть включены в один из векторов, кодирующих переменный участок, или предусмотрены в отдельном векторе.

Раскрытые в данном документе системы разработаны так, чтобы обеспечить эффективное конструирование векторов и быстрое выделение требуемых клонов, а использование двух локусов, обеспечивающих повышенную экспрессию, также является важным для создания стабильной линии клеток. В некоторых вариантах осуществления система разработана для применения негативной селекции для идентификации трансформантов, характеризующихся присутствием предусмотренной сайт-специфической интеграции (например, отсутствие флуоресценции вследствие того, что один или более генов флуоресцентного маркера в геноме хозяина удаляются после RMCE). Один цикл негативной селекции может занять всего две недели; однако эффективность выделения клонов, имеющих предусмотренную рекомбинацию, может быть ограниченной (приблизительно 1%). При комбинировании негативной селекции с позитивной селекцией, основывающейся на новом селектируемом маркере, который предусматривает интегрированную(интегрированные) нуклеиновую(нуклеиновые) кислота(кислоты) (такой как новый флуоресцентный маркер или маркер устойчивости к лекарственному средству или антибиотику, например, в расщепленном формате), эффективность выделения клонов, имеющих предусмотренную рекомбинацию, может быть значительно улучшена (от приблизительно 40% до приблизительно 80%). Данные системы могут включать дополнительные компоненты, реактивы или информацию, например, протоколы для внедрения вектора(векторов) системы в клетку системы посредством трансфекции. Неограничивающие способы трансфекции включают способы химической трансфекции, включающие приме-

нение липосом; наночастиц; фосфата кальция (Graham et al. (1973) *Virology* 52 (2): 456-67, Bacchetti et al. (1977) *Proc Natl Acad Sci USA* 74 (4): 1590-4, и Kriegler, M (1991). *Transfer and Expression: A Laboratory Manual*. New York: W. H. Freeman and Company, pp. 96-97); дендримеров или катионных полимеров, таких как DEAE-декстран или полиэтиленмин. Нехимические способы включают электропорацию; сонопорацию и оптическую трансфекцию. Трансфекция на основе частиц включает применение генной пушки, магнитную трансфекцию (Bertram, J. (2006) *Current Pharmaceutical Biotechnology* 7, 277-28). Для трансфекции также можно применять способы на основе вирусов. Доставка мРНК включает способы с использованием TransMessenger™ и TransIT® (Bire et al. *BMC Biotechnology* 2013, 13:75). Одним широко применяемым способом введения гетерологичной ДНК в клетку является осаждение фосфатом кальция, например, как описано в Wigler et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3567, 1980). Полиэтилениндуцированное слияние бактериальных протопластов с клетками млекопитающих (Schaffner et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2163) представляет собой другой пригодный способ введения гетерологичной ДНК. Для введения ДНК непосредственно в цитоплазму клетки-хозяина можно также использовать электропорацию, например, как описано в Potter et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:7161, 1988) или в Shigekawa et al. (*BioTechniques* 6:742, 1988). Были описаны другие реактивы, пригодные для введения гетерологичной ДНК в клетку млекопитающего, такие как реактив Lipofectin™ и реактив Lipofectamine™ (Gibco BRL, Гейтерсберг, Мэриленд). Оба этих коммерчески доступных реактива применяются для образования комплексов из липида и нуклеиновой кислоты (или липосом), которые облегчают захват нуклеиновой кислоты в клетки при нанесении на культивируемые клетки.

Способы получения антигенсвязывающих белков.

Настоящее изобретение также предусматривает способы получения биспецифических антигенсвязывающих белков. При использовании раскрытых в данном документе способов требуемый антигенсвязывающий белок можно продуцировать с высокими титрами и/или высокой удельной продуктивностью (пг/клетка/день). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок продуцируют с титром, составляющим по меньшей мере 1 г/л, 1,5 г/л, 2,0 г/л, 2,5 г/л, 3,0 г/л, 3,5 г/л, 4,0 г/л, 4,5 г/л, 5,0 г/л, 10 г/л или больше. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок продуцируют с удельной продуктивностью, составляющей по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 пикограмм/клетка/день (pcd) или больше, которую определяют на основании общего количества антигенсвязывающих белков (в пг), продуцируемых клеткой в день. В некоторых вариантах осуществления биспецифический антигенсвязывающий белок продуцируют при соотношении титра биспецифического антигенсвязывающего белка и общего титра антигенсвязывающих белков, составляющем по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60% или больше.

В одном варианте осуществления способа используют систему, раскрытую в данном документе, и внедряют векторы в клетку системы посредством трансфекции. Трансфицированные клетки, где экзогенные нуклеиновые кислоты были надлежащим образом интегрированы посредством RMCE в два локуса клетки, обеспечивающих повышенную экспрессию, можно подвергнуть скринингу и идентифицировать. В некоторых вариантах осуществления идентификация трансфицированных клеток достигается с помощью негативной селекции в отношении одного или более селективируемых маркеров, присутствующих в клетке-хозяине до трансфекции. В других вариантах осуществления идентификация трансфицированных клеток достигается с помощью негативной селекции в отношении одного или более селективируемых маркеров, присутствующих в клетке-хозяине до трансфекции, в комбинации с позитивной селекцией, основывающейся на одном или более селективируемых маркерах, которые предусматривают нуклеиновые кислоты в сконструированных для интеграции векторах. Полипептиды, содержащие HCF, и полипептиды, содержащие LCF, могут быть экспрессированы из интегрированных нуклеиновых кислот, а антигенсвязывающий белок, представляющий интерес, можно получить из идентифицированной трансфицированной клетки и очистить с применением известных способов.

В другом варианте осуществления способа просто используют клетку, описанную выше в данном документе, которая содержит экзогенные нуклеиновые кислоты, интегрированные в два локуса, обеспечивающие повышенную экспрессию, которые вместе кодируют антигенсвязывающий белок и экспрессируют антигенсвязывающий белок из клетки. Каждая клонированная кассета (кассеты) экспрессии является (являются) смежной (смежными) с каждым конкретным сайтом интеграции.

Настоящее описание дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует понимать как ограничивающие каким-либо образом. Содержание всех приведенных ссылок (включая ссылки на литературу, выданные патенты и опубликованные патентные заявки, приводимые в настоящей заявке) тем самым явным образом включается в настоящий документ посредством ссылки.

Примеры

Пример 1. Экспрессия моноспецифических антител (Ab) в двух конкретных локусах, обеспечивающих повышенную экспрессию (посредством сайт-специфической интеграции).

Цепи Ab (AbC1, AbC2) клонировали в векторы, в которых сайты RSS фланкируют кассеты экспрессии Ab и кассету экспрессии селективируемого маркера, как показано на фиг. 1. Две цепи Ab могут быть клонированы в отдельные векторы или объединены в один вектор, в котором 2 кассеты экспрессии рас-

положены тандемно в любом возможном порядке: AbC1, AbC2 и селектируемый маркер, например, где AbC1 эквивалентна общепринятой LC, и AbC2 эквивалентна общепринятой тяжелой цепи.

Вкратце, ДНК, кодирующую домены VH и VL, можно выделять напрямую из отдельных антиген-положительных В-клеток посредством ПЦР. Продукты ПЦР, представляющие собой тяжелые цепи и легкие цепи, клонировали в Sap I-линеаризованный вектор антитела, содержащий константный участок тяжелой цепи IgG и константный участок легкой каппа-цепи соответственно. Плазмида тяжелой цепи (AbC2) имеет сайты RRS3 и RRS2, фланкирующие кассеты экспрессии тяжелой цепи. Кроме того, непосредственно ниже RRS3 в плазмиде тяжелой цепи находится расщепленный селектируемый маркерный ген (например, US7582298). Плазмида легкой цепи имеет сайты RRS1 и RRS3, которые фланкируют кассету экспрессии легкой цепи. Кроме того, плазмида легкой цепи содержит сильный промотор непосредственно перед ATG в RRS3 таким образом, что при интеграции в локус клетки-хозяина проксимальный к RRS3 промотор и иницирующий ATG плазмиды легкой цепи становятся смежными с селектируемым маркерным геном в плазмиде тяжелой цепи в правильной рамке считывания с обеспечением транскрипции и трансляции селектируемого гена. Очищенные рекомбинантные плазмиды, имеющие последовательность вариабельного участка тяжелой цепи, и плазмиды, имеющие последовательность вариабельного участка легкой цепи, из одной и той же В-клетки объединяли и трансфицировали совместно с плазмидой, которая экспрессирует рекомбиназу, в модифицированную линию клеток-хозяев CHO, характеризующуюся соответствующими RSS и селектируемыми маркерами в локусах SEQ ID NO: 1 (EESYR®; локус 1) и SEQ ID NO: 2. Модифицированная линия клеток-хозяев CHO содержит 4 разных селектируемых маркера в двух транскрипционно активных локусах. Следовательно, в случае, когда селектируемые маркеры представляют собой различные флуоресцентные маркеры, получаемую клетку CHO можно выделять посредством проточной цитометрии в отношении позитивных и негативных комбинаций, представляющих собой требуемые клеточные рекомбинанты. В случае, когда рекомбинантные плазмиды, экспрессирующие гены тяжелой цепи и легкой цепи, трансфицируют совместно с плазмидой, экспрессирующей рекомбиназу, сайт-специфическая рекомбинация, опосредованная рекомбиназой, приводит к интеграции плазмид, содержащих гены антител, в каждый хромосомный локус, содержащий RRS, и замене. Соответственно, рекомбинантные клетки, экспрессирующие моноспецифическое антитело, выделяли и подвергали 12-дневному продуцированию с подпиткой, с последующим отбором проб и осуществлением анализа Octet для определения титра с применением иммобилизованного белка А. Было обнаружено, что клетки являются изогенными и стабильными. Обнаруживали увеличение суммарного титра в небольшой встряхиваемой колбе в отношении экспрессии моноспецифических антител при использовании способа интеграции в два сайта, с существенным увеличением количества антитела В, приводящим к почти удвоенному титру (фиг. 2).

Пример 2. Экспрессия биспецифических антител (BsAb) в двух конкретных локусах, обеспечивающих повышенную экспрессию (посредством сайт-специфической интеграции).

Для обеспечения экспрессии биспецифических антител три цепи антител и два селектируемых маркера клонировали в плазмиды аналогично примеру 1 таким образом, что AbC1, AbC2 и селектируемый маркер 1 фланкированы сайтами RRS, совместимыми с первым локусом или сайтом интеграции (EESYR®, SEQ ID NO: 1; локус 1), и AbC1, AbC3, селектируемый маркер 2 являются совместимыми со вторым локусом или сайтом интеграции (SEQ ID NO: 2). Согласно наблюдениям авторов настоящего изобретения AbC1, такая как общепринятая LC, не требует двух копий гена для необходимого уровня экспрессии. Для каждого сайта получали 1 или 2 плазмиды, в которых 3 кассеты экспрессии либо расположены тандемно, либо расположены в 2-х плаزمидках, где 2 кассеты экспрессии клонируют в один вектор и оставшуюся кассету экспрессии клонируют во второй вектор. См. фиг. 3.

В случае, когда рекомбинантные плазмиды, экспрессирующие гены тяжелой цепи и легкой цепи, трансфицируют совместно с плазмидой, экспрессирующей рекомбиназу, сайт-специфическая рекомбинация, опосредованная рекомбиназой, приводит к интеграции плазмид, содержащих гены антител, в каждый хромосомный локус, содержащий RRS, и замене. Соответственно, рекомбинантные клетки, экспрессирующие биспецифическое антитело, выделяли и подвергали 12-дневному продуцированию с подпиткой, с последующим отбором проб и осуществлением анализа Octet для определения титра с применением иммобилизованного антитела к Fc и второго антитела к Fc* (модифицированного идентифицирующего антитела к Fc, см. документ US 2014-0134719 A1, опубликованный 15 мая 2014 г.). Было обнаружено, что клетки являются изогенными и стабильными. Обнаруживали значительное увеличение суммарного титра в небольшой встряхиваемой колбе от 1,75 до более чем 2 раз вследствие применения способа интеграции в два сайта (фиг. 5).

Пример 3. Крупномасштабное производство биспецифических и моноспецифических антител после сайт-специфической интеграции.

Клетки-хозяева (CHO-K1) создавали, как описано выше, аналогично примеру 1 (см. также фиг. 3 для биспецифических антител и фиг. 1 для моноспецифических антител). Клетки-хозяева, способные к RMCE генных кассет в локусе EESYR® (локус 1) и SEQ ID NO: 2 (локус 2), сравнивали с клетками-хозяевами, способными к RMCE генных кассет только в одном сайте интеграции (локус 1/EESYR®).

Векторы, несущие нуклеиновые кислоты легкой цепи и тяжелой цепи антитела (AbC1, AbC2, AbC3), и необходимого RRS, и селективируемого маркера (см. фиг. 3), рекомбинировали в линиях клеточных продуцентов (RSX^{2BP}) с созданием клеток-хозяев, экспрессирующих Ab E, Ab F, Ab G и Ab H. Соответственно, каждая клетка-хозяин биспецифического антитела экспрессирует одну общую легкую цепь и две тяжелые цепи, которые связывают разные антигены, при этом одна из тяжелых цепей характеризуется тем, что ее домен СН3 сконструирован таким образом, чтобы обеспечивать дифференциальное связывание белка А (как описано в патенте США № 8586713, включенном в данный документ посредством ссылки).

Для моноспецифических антител легкую цепь и тяжелые цепи антитела (AbC1, AbC2) клонировали в векторы, в которых сайты RSS фланкируют кассеты экспрессии Ab (и кассета экспрессии также предусматривает селективируемый маркерный ген), как показано на фиг. 1. Осуществляли рекомбинацию с созданием клеток-хозяев (RSX²), экспрессирующих Ab J и Ab K.

Биореакторы с объемами 2 л, 15 л или 50 л инокулировали посевной культурой линии клеток, продуцирующей антитела, RSX², полученной из CHO-K1. Инокулированные клетки выращивали при 36,5°C в течение тринадцати дней и подкармливали глюкозой и другими дополнительными питательными веществами по мере необходимости. Клетки выращивали в основной среде с заданным химическим составом (без гидролизата и без сыворотки). Общие антитела собирали и подвергали очистке.

Общее содержание антител IgG (титр) определяли после проведения хроматографии белка А/белка G. Для биспецифических антител общее содержание антител IgG, а также каждую из трех разновидностей антител, включая биспецифические (гетеродимерные Fc/Fc*), гомодимер с тяжелыми цепями дикого типа (Fc/Fc) и гомодимер с модифицированными тяжелыми цепями (Fc*/Fc*), измеряли для того, чтобы определить соотношение требуемой разновидности биспецифических антител. Общие титры определяли с помощью метода HPLC с использованием колонок с белком А/белком G, применяя методики элюирования как описано в патенте США №8586713. Вкратце, три разновидности, полученные в биореакторах, связываются с колонками при загрузке образцов, и биспецифическая разновидность (Fc/Fc*) элюируется первой из колонки с белком А, характеризующейся ступенчатым градиентом рН в присутствии ионного модификатора. Биспецифическую разновидность собирают в ходе первой стадии элюирования с последующим элюированием двух гомодимерных разновидностей.

В табл. 1 показано, что суммарный (общий) титр IgG и титр биспецифических антител (фиг. 6А) в экспериментальной культуре для крупномасштабного производства были значительно улучшены при использовании клеток-хозяев, экспрессирующих антитело посредством двух сайтов интеграции.

Таблица 1

Измерение титров общего IgG и биспецифического IgG

Антитело	Биспецифический титр (г/л)		Общий титр (г/л)	
	Два сайта (локус 1/локус 2)	Один сайт (локус 1)	Два сайта (локус 1/локус 2)	Один сайт (локус 1)
Ab E	2,25	0,87	4,47	2,7
Ab F	1,45	0,7	2,9	2,4
Ab G	1,6	0,5	2,7	1,3
Ab H	2	1	3,2	2,5

Биспецифические титры определяли, как описано выше. Как видно из таблицы 2, титры биспецифического антитела как отношение к общему титру IgG, продуцируемого клеткой, значительно выше в производственных культурах клеток-хозяев, имеющих конструкцию с двумя сайтами интеграции. См. фиг. 6В. В действительности, стало неожиданностью, что стабильно достигали соотношения биспецифических антител, составляющего 50% или больше.

Таблица 2

Соотношение продуцирования биспецифических антител и общего IgG

	Биспецифический коэффициент (% общего IgG)	
	Два сайта (локус 1/локус 2)	Один сайт (локус 1)
Ab E	50%	32%
Ab F	50%	29%
Ab G	59%	38%
Ab H	63%	40%

Экспрессию моноспецифических антител обеспечивали с использованием способа с двумя сайтами интеграции для определения улучшений в суммарных титрах IgG. В табл. 3 проиллюстрировано, что наблюдали значительное увеличение суммарного титра в биореакторе укрупненного масштаба в диапазоне от 0,6 до 1,3 раза. См. также фиг. 7. Для производственных биореакторов, применяемых на производстве, особенно таковых с объемами культур, составляющими от 500 л до 10000 л, наблюдаемые увеличения

титра вследствие использования данных линий клеток эквивалентны значительному увеличению выхода продукта на партию.

Таблица 3
Измерение титра общего IgG (моноспецифического)

	Общий титр (г/л)	
	Два сайта (локус 1/локус 2)	Один сайт (локус 1)
Ab J	3,3	2,2
Ab K	3,2	2

Несмотря на то, что вышеприведенное изобретение было подробно описано с помощью иллюстраций и примеров, для специалистов в данной области техники сразу будет очевидно, что определенные изменения и модификации могут быть внесены в идеи изобретения без отклонения от истинного смысла или объема прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Клетка для экспрессии антигенсвязывающего белка, содержащая первую экзогенную нуклеиновую кислоту, интегрированную в первый локус, обеспечивающий повышенную экспрессию; и вторую экзогенную нуклеиновую кислоту, интегрированную во второй локус, обеспечивающий повышенную экспрессию; где первая и вторая экзогенные нуклеиновые кислоты вместе кодируют антигенсвязывающий белок, где антигенсвязывающий белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, и где один из двух локусов, обеспечивающих повышенную экспрессию, содержит нуклеотидную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 1, и другой из двух локусов, обеспечивающих повышенную экспрессию, содержит нуклеотидную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

2. Клетка по п.1, где первая экзогенная нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первый фрагмент тяжелой цепи (HCF), а вторая экзогенная нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первый фрагмент легкой цепи (LCF).

3. Клетка по п.2, где антигенсвязывающий белок является моноспецифическим.

4. Клетка по п.2 или 3, где вторая экзогенная нуклеиновая кислота дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую второй HCF.

5. Клетка по п.4, где первый и второй HCF отличаются.

6. Клетка по п.5, где антигенсвязывающий белок является биспецифическим.

7. Клетка по п.4, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первый HCF, кодирует первый домен СН3, и где нуклеотидная последовательность, кодирующая второй HCF, кодирует второй домен СН3.

8. Клетка по п.7, где первый и второй домены СН3 отличаются по меньшей мере одним аминокислотным положением, или

где нуклеотидные последовательности, кодирующие первый и второй домены СН3, отличаются друг от друга тем, что одна из нуклеотидных последовательностей модифицирована по кодам.

9. Клетка по п.4, где первая экзогенная нуклеиновая кислота дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую второй LCF.

10. Клетка по п.9, где первый и второй LCF содержат одинаковые аминокислоты.

11. Клетка по любому из пп.2-10, где каждая из нуклеотидных последовательностей, кодирующих HCF или LCF, функционально связана с промотором.

12. Клетка по п.2, где первый сайт распознавания для рекомбиназы (RRS) и второй RRS расположены соответственно с 5'-конца и 3'-конца относительно первой экзогенной нуклеиновой кислоты, а третий RRS и четвертый RRS расположены соответственно с 5'-конца и 3'-конца относительно второй экзогенной нуклеиновой кислоты, где первый и второй RRS отличаются, и третий и четвертый RRS отличаются.

13. Клетка по п.12, где первый, второй, третий и четвертый RRS отличаются друг от друга.

14. Клетка по п.4, где первый дополнительный RRS находится между нуклеотидной последовательностью, кодирующей первый LCF, и нуклеотидной последовательностью, кодирующей второй HCF, и где указанный дополнительный RRS отличается от каждого из первого, второго, третьего и четвертого RRS.

15. Клетка по п.9, где первый RRS и второй RRS расположены соответственно с 5'-конца и 3'-конца относительно первой экзогенной нуклеиновой кислоты, а третий RRS и четвертый RRS расположены соответственно с 5'-конца и 3'-конца относительно второй экзогенной нуклеиновой кислоты, где первый и второй RRS отличаются, и третий и четвертый RRS отличаются.

16. Клетка по п.15, где первый и второй HCF являются одинаковыми, и первый и второй LCF являются одинаковыми, и где первый и третий RRS являются одинаковыми, и второй и четвертый RRS явля-

ются одинаковыми.

17. Клетка по п.15, где первый и второй HCF отличаются, а первый и второй LCF являются одинаковыми, и где первый, второй, третий и четвертый RRS отличаются друг от друга.

18. Клетка по любому из п.16 или 17, где первый дополнительный RRS находится между нуклеотидной последовательностью, кодирующей первый LCF, и нуклеотидной последовательностью, кодирующей второй HCF, во второй экзогенной нуклеиновой кислоте, при этом первый дополнительный RRS отличается от первого, второго, третьего и четвертого RRS.

19. Клетка по п.18, где второй дополнительный RRS находится между нуклеотидной последовательностью, кодирующей второй LCF, и нуклеотидной последовательностью, кодирующей первый HCF, при этом первый и второй RRS являются одинаковыми или отличаются, и каждый отличается от первого, второго, третьего и четвертого RRS.

20. Система для экспрессии антигенсвязывающего белка, содержащая клетку и набор векторов, где клетка содержит интегрированные в первый локус, обеспечивающий повышенную экспрессию, в направлении от 5'-конца к 3'-концу: первый RRS, первую экзогенную нуклеиновую кислоту и второй RRS; интегрированные во второй локус, обеспечивающий повышенную экспрессию, в направлении от 5'-конца к 3'-концу: третий RRS, вторую экзогенную нуклеиновую кислоту и четвертый RRS; где один из двух локусов, обеспечивающих повышенную экспрессию содержит нуклеотидную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 1, и другой из двух локусов, обеспечивающих повышенную экспрессию, содержит нуклеотидную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3,

где первый и второй RRS отличаются, и третий и четвертый RRS отличаются; и где первый и второй локусы, обеспечивающие повышенную экспрессию, отличаются;

где набор векторов содержит первый вектор, содержащий в направлении от 5'-конца к 3'-концу 5'-RRS первого вектора, первую нуклеиновую кислоту и 3'-RRS первого вектора, при этом 5'- и 3'-RRS первого вектора отличаются; второй вектор, содержащий в направлении от 5'-конца к 3'-концу 5'-RRS второго вектора, вторую нуклеиновую кислоту и 3'-RRS второго вектора, при этом 5'- и 3'-RRS второго вектора отличаются; нуклеотидную последовательность, кодирующую первый HCF, и нуклеотидную последовательность, кодирующую первый LCF, где одна из нуклеотидных последовательностей находится в первой нуклеиновой кислоте, а другие нуклеотидные последовательности находятся во второй нуклеиновой кислоте; где первый HCF и первый LCF представляют собой участки антигенсвязывающего белка, где антигенсвязывающий белок представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела; и где при введении векторов в клетку первая и вторая нуклеиновые кислоты в векторах интегрируются соответственно в первый локус, обеспечивающий повышенную экспрессию, и во второй локус, обеспечивающий повышенную экспрессию, посредством рекомбинации, опосредованной RRS.

21. Система по п.20, где антигенсвязывающий белок представляет собой моноспецифический антигенсвязывающий белок.

22. Система по п.21, где первый и третий RRS являются одинаковыми, и второй и четвертый RRS являются одинаковыми.

23. Система по п.22, где первый дополнительный RRS присутствует между первым и вторым RRS в первом локусе.

24. Система по п.23, где 5'-RRS первого вектора является одинаковым по сравнению с первым и третьим RRS; 3'-RRS первого вектора, 5'-RRS второго вектора и первый дополнительный RRS являются одинаковыми; а 3'-RRS второго вектора является одинаковым по сравнению со вторым и четвертым RRS.

25. Система по п.24, где нуклеотидная последовательность, кодирующая LCF, находится в первом векторе, а нуклеотидная последовательность, кодирующая HCF, находится во втором векторе.

26. Система по п.21, где 5'-RRS первого вектора является одинаковым по сравнению с первым RRS, а 3'-RRS первого вектора является одинаковым по сравнению со вторым RRS; и где 5'-RRS второго вектора является одинаковым по сравнению с третьим RRS, а 3'-RRS второго вектора является одинаковым по сравнению с четвертым RRS.

27. Система по п.21, где антигенсвязывающий белок представляет собой биспецифический антигенсвязывающий белок.

28. Система по п.27, дополнительно содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую второй HCF, который отличается от первого HCF.

29. Система по п.28, где обе из нуклеотидной последовательности, кодирующей первый LCF, и нуклеотидной последовательности, кодирующей второй HCF, включены в первую нуклеиновую кислоту в первом векторе, а нуклеотидная последовательность, кодирующая первый HCF, находится во втором векторе.

30. Система по п.29, где 5'-RRS первого вектора является одинаковым по сравнению с первым RRS, 3'-RRS первого вектора является одинаковым по сравнению со вторым RRS, 5'-RRS второго вектора является одинаковым по сравнению с третьим RRS, а 3'-RRS второго вектора является одинаковым по сравнению с четвертым RRS.

31. Система по п.28, где нуклеотидная последовательность, кодирующая второй HCF, находящаяся в третьем отдельном векторе, фланкирована 5'-RRS третьего вектора и 3'-RRS третьего вектора.

32. Система по п.31, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первый LCF, находится в первом векторе, нуклеотидная последовательность, кодирующая первый HCF, находится во втором векторе, 5'-RRS первого вектора является одинаковым по сравнению с первым RRS, 3'-RRS первого вектора является одинаковым по сравнению с 5'-RRS второго вектора и первым дополнительным RRS, и 3'-RRS второго вектора является одинаковым по сравнению со вторым RRS, 5'-RRS третьего вектора является одинаковым по сравнению с третьим RRS, и 3'-RRS третьего вектора является одинаковым по сравнению с четвертым RRS, где первый дополнительный RRS включен в первый локус между первым и вторым RRS.

33. Система по п.29, дополнительно содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую второй LCF.

34. Система по п.33, где первый и второй LCF содержат одинаковые аминокислотные последовательности.

35. Система по п.34, где нуклеотидная последовательность, кодирующая второй LCF, находится во второй нуклеиновой кислоте второго вектора, при этом 5'-RRS первого вектора является одинаковым по сравнению с первым RRS, 3'-RRS первого вектора является одинаковым по сравнению со вторым RRS, 5'-RRS второго вектора является одинаковым по сравнению с третьим RRS, а 3'-RRS второго вектора является одинаковым по сравнению с четвертым RRS.

36. Система по п.34, где нуклеотидная последовательность, кодирующая второй LCF, находящаяся в третьем отдельном векторе, фланкирована 5'-RRS третьего вектора и 3'-RRS третьего вектора.

37. Система по п.36, где 5'- и 3'-RRS первого вектора являются идентичными соответственно первому и второму RRS в первом локусе; 5'-RRS третьего вектора является одинаковым по сравнению с третьим RRS, 3'-RRS третьего вектора является одинаковым по сравнению с 5'-RRS второго вектора и дополнительным RRS, присутствующим между третьим и четвертым RRS во втором локусе, 3'-RRS второго вектора является одинаковым по сравнению с четвертым RRS.

38. Система по п.28, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первый HCF, кодирует первый домен CH3, а нуклеотидная последовательность, кодирующая второй HCF, кодирует второй домен CH3.

39. Система по п.38, где первый и второй домены CH3 отличаются на по меньшей мере одну аминокислоту, или где нуклеотидные последовательности, кодирующие первый и второй домены CH3, отличаются тем, что одна из нуклеотидных последовательностей была модифицирована по кодонам.

40. Система по п.20, где каждая из нуклеотидной последовательности, кодирующей первый HCF, и нуклеотидной последовательности, кодирующей первый LCF, является функционально связанной с промотором.

41. Система по п.20, где клетка представляет собой клетку CHO.

42. Система по п.41, где один из двух локусов, обеспечивающих повышенную экспрессию, включают нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1, и другой локус включает нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 2.

43. Способ для экспрессии антигенсвязывающего белка, включающий:

(i) обеспечение системы по любому из пп.20-42;
(ii) введение векторов в клетку посредством трансфекции и
(iii) отбор трансфицированной клетки, где нуклеиновые кислоты в векторах интегрируются в первый и второй локусы, обеспечивающие повышенную экспрессию, посредством рекомбинации, опосредованной RRS.

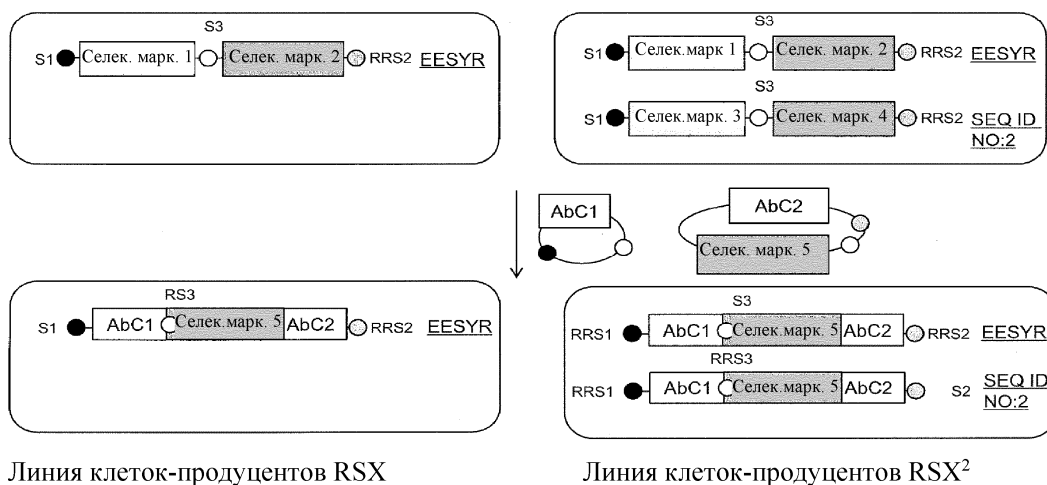
44. Способ по п.43, дополнительно включающий

(iv) экспрессию и получение антигенсвязывающего белка из отобранной трансфицированной клетки.

45. Способ получения антигенсвязывающего белка, включающий обеспечение клетки по любому из пп.1-19 и экспрессию, и получение антигенсвязывающего белка из клетки.

Сайт-специфическая интеграция по одному сайту в линию клеток-хозяев

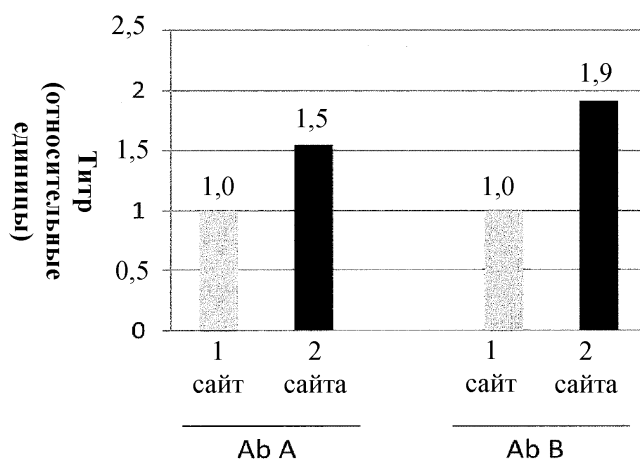
Сайт-специфическая интеграция по двум сайтам в линию клеток-хозяев



Линия клеток-продуцентов RSX

Линия клеток-продуцентов RSX²

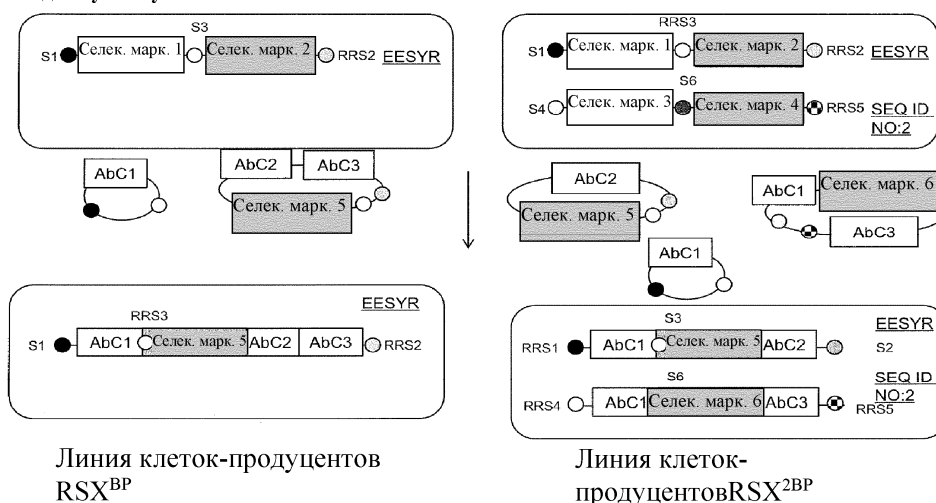
Фиг. 1



Фиг. 2

Сайт-специфическая интеграция по одному сайту в линию клеток-хозяев

Сайт-специфическая интеграция по двум сайтам в линию клеток-хозяев



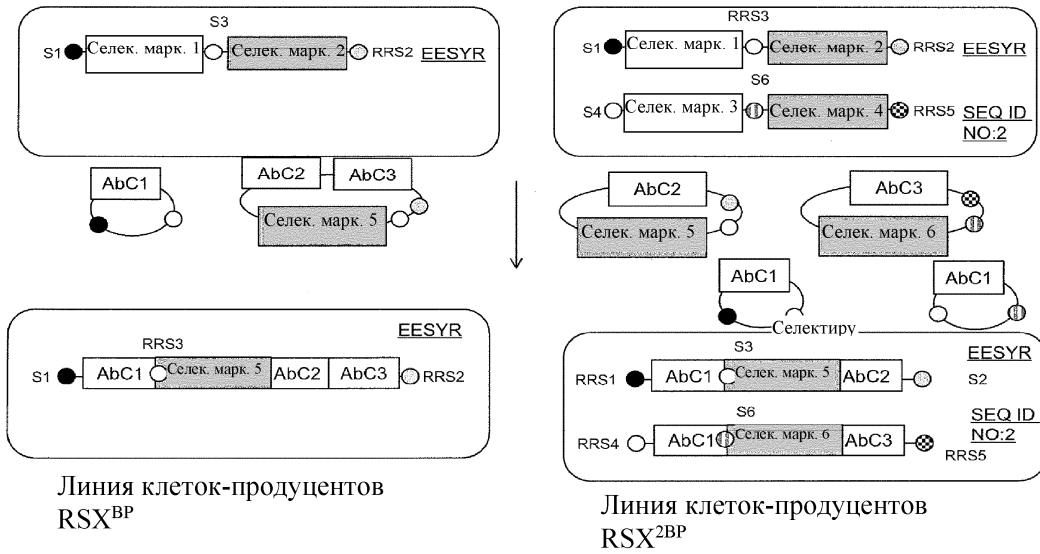
Линия клеток-продуцентов RSX^{BP}

Линия клеток-продуцентов RSX^{2BP}

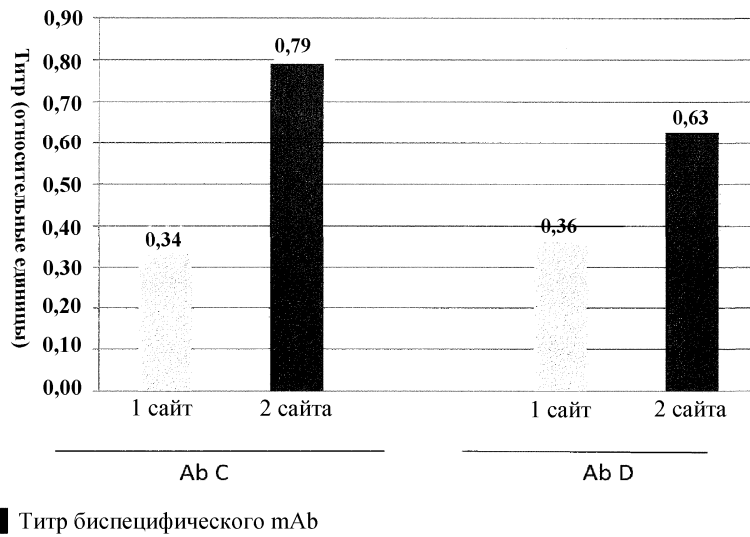
Фиг. 3

Сайт-специфическая интеграция по одному сайту в линию клеток-хозяев

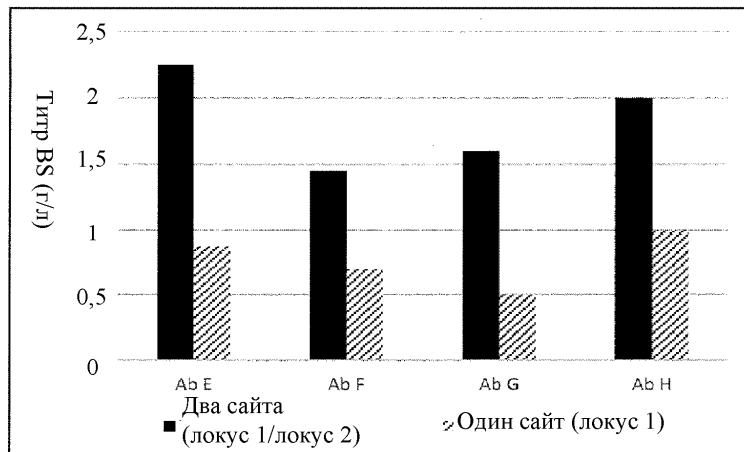
Сайт-специфическая интеграция по двум сайтам в линию клеток-хозяев



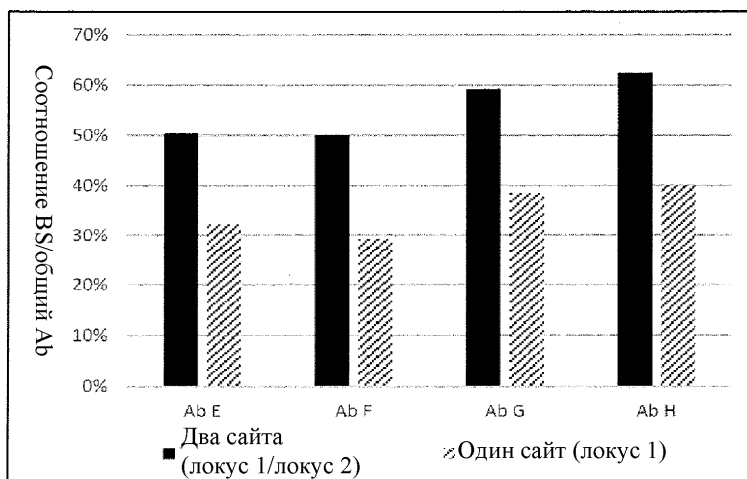
Фиг. 4



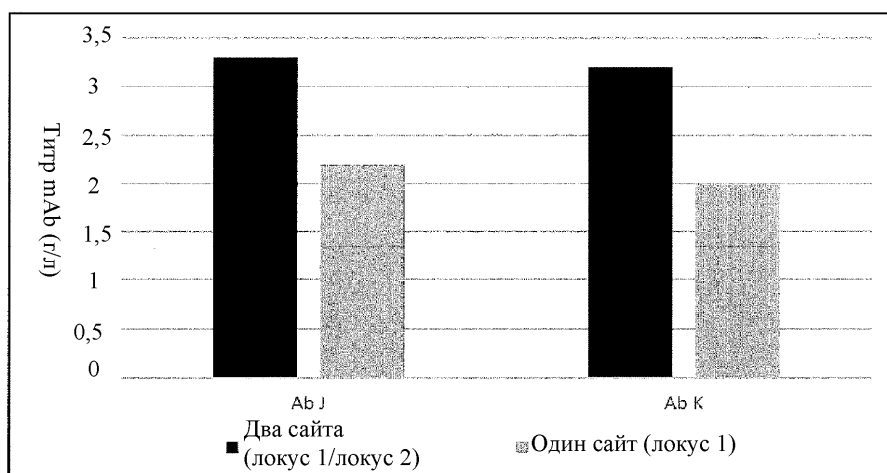
Фиг. 5



Фиг. 6А



Фиг. 6B



Фиг. 7

