

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202392518** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2024.03.29

(51) Int. Cl. *C07K 16/00* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.03.11

---

(54) **ВАРИАНТЫ НЕАКТИВИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ**

---

(31) 21162341.8

(32) 2021.03.12

(33) EP

(86) PCT/EP2022/056416

(87) WO 2022/189667 2022.09.15

(71) Заявитель:  
ГЕНМАБ А/С (DK)

(72) Изобретатель:

Де Крёк Барт-Ян, Хибберт Ричард,  
Схюрман Жанин, Лабрейн Аран Ф.  
(NL)

(74) Представитель:

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

---

(57) В изобретении описаны белки, содержащие Fc-область или подобную область, такие как моноклональные, биспецифические и мультиспецифические антитела, в которых Fc-область модифицировали для элиминации или значительного снижения опосредуемых Fc эффекторных функций, и в то же время обеспечивая успешное совершенствование для терапевтических целей, и в случаях, когда эффекторные функции являются нежелательными.

---

**A1**

**202392518**

**202392518**

**A1**

## ВАРИАНТЫ НЕАКТИВИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ

5 Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к полипептидам, содержащим Fc-область или подобные области, таким как моноклональные, биспецифические и мультиспецифические антитела, в которых Fc-область модифицирована для элиминации или значительного снижения опосредуемых Fc эффекторных функций, и которые в то же время можно, например, успешно совершенствовать для терапевтических целей и применять в тех случаях, когда эффекторные функции являются нежелательными.

Введение

15 Установлено, что антитела являются ценными в качестве терапевтических молекул, в частности, для лечения рака и для иммунной модуляции.

Специфические для опухолей-мишеней антитела могут обладать цитотоксичностью в отношении опухолевых клеток, как правило, в результате опосредуемых Fc эффекторных функций, таких как комплементзависимая цитотоксичность (CDC), антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC) или антитело-обусловленный клеточнозависимый фагоцитоз (ADCP). Таргетирующие иммунные клетки антитела могут стимулировать клетки иммунной системы, такие как Т-клетки и макрофаги, которые в свою очередь могут усиливать цитотоксичность в отношении опухолевых клеток. Антитела, таргетирующие компоненты иммунной системы, можно применять для модуляции функции иммунной системы.

25 В некоторых ситуациях активация иммунной системы или ее компонентов при терапии на основе антител может оказаться нежелательной, например, при применении для (I) системной нейтрализации цитокинов, (II) блокирования специфических рецепторов иммунных клеток или (III) при использовании биспецифических антител для перенаправления эффекторных клеток на пораженную ткань-мишень (Kang и др., Exp. Mol. Med. 51(11), 2019, сс. 1-9). Например, взаимодействие антител, таргетирующих иммунные клетки, через их Fc-области с компонентом комплемента C1q может инициировать активацию классической системы комплемента, что приводит, например, к CDC в

отношении иммунных клеток-мишеней, что является нежелательным. Кроме того, Fc-области антител могут связываться также с Fc-рецепторами, которые экспрессируются на многих типах иммунных клеток, что приводит к нежелательному истощению эффекторных клеток или индуцирует связанную с иммунной системой токсичность из-за высокого уровня секреции цитокинов.

Во избежание нежелательных опосредуемых Fc эффекторных функций конструировали антитела, несущие мутации в Fc-фрагменте (которые обозначают также как неактивирующие мутации), которые подавляют или элиминируют некоторые или все опосредуемые Fc эффекторные механизмы.

Для элиминации опосредуемых Fc эффекторных функций разработан широкий спектр различных форматов неактивирующих антител, в которых в константную область тяжелой цепи антитела IgG1-изотипа интродуцированы аминокислотные замены и их комбинации (см., например, Chiu и др., *Antibodies* 8(4), декабрь 2019 г., с. 55; Liu и др., *Antibodies*, 9(4), 17 ноября 2020 г, с. 64; Shields и др., *J Biol Chem.*, 276(9), 2 марта 2001 г., сс. 6591-6604). Примеры указанных замен включают интродукцию неактивирующей мутации N297G (Тао и Morrison, *J. Immunol* 143(8), 1989, сс. 2595-2601), интродукцию неактивирующих мутаций E233P-L234V-L235A-delG236-S267K (Moore и др., *Methods* 154, 2019, сс. 38-50), интродукцию неактивирующих мутаций L234A-L235A-P329G (Schlothauer и др., *Protein Eng. Design and Selection* 29(10), 2016, сс. 457-466) или интродукцию неактивирующих мутаций L234F-L235E-D265A (которые в настоящем описании обозначены также как формат FEA или FEA, Engelberts и др., *EBioMedicine* 52, 2020, с. 102625; US 10590206B2). Другие неактивирующие форматы разрабатывали на основе IgG4, одного из подклассов IgG с пониженными эффекторными функциями, в сочетании с аминокислотными заменами в константной области тяжелой цепи антитела для дополнительной элиминации опосредуемых Fc эффекторных функций (например, путем интродукции неактивирующих мутаций E233P-F234V-L235A-G236del, описанных в WO 2015/143079, или интродукции неактивирующих мутаций F234A-L235A, описанных у Vafa и др., *Methods* 65, 2014, сс. 114-126).

Однако в результате такой инженерии антител могут возникать проблемы с возможностью усовершенствования и производства, которые могут

ограничивать потенциальную разработку антител в качестве терапевтических средств. Например, инактивация вируса представляет собой имеющую решающее значение стадию при разработке потенциального терапевтического антитела. Для осуществления стандартного протокола инактивации вируса 5 требуется поддерживать низкое значение рН. Однако сконструированные белки, такие как антитела, могут по-разному реагировать на условия низкого рН, что может приводить к нестабильности белков. Другими условиями, которые, например, необходимо оценивать при разработке антител и возможности их производства, являются повторяющиеся циклы замораживания-оттаивания и 10 колебания температуры хранения. Таким образом, желательно разрабатывать терапевтические средства на основе антител, которые позволяют сохранять стабильность белка при воздействии указанных условий и т.п., поскольку это обеспечивает простоту производства и сбыта, а также клиническое применение таких продуктов.

15 Таким образом, существует потребность в получении дополнительных неактивирующих форматов, приемлемых для антител, которые лишены опосредуемых Fc эффекторных функций и которые легко разрабатывать и производить для терапевтического применения.

#### Краткое изложение сущности изобретения

20 Установлено, что неактивирующие мутации L234F-L235E-D265A (которые в настоящем описании обозначены также как формат FEA или FEA), обладают очень хорошим профилем безопасности и способностью значительно подавлять опосредуемую Fc эффекторную функцию. Однако касательно антител IgG1-изотипа, которые являются эффективными индукторами комплементзависимой 25 цитотоксичности (CDC), несущих FEA-мутации, может иметь место некоторая остаточная CDC (см., например, примеры 3 и 5). Кроме того, установлено, что рекомбинантно экспрессируемые антитела FEA-формата могут отличаться повышенной гетерогенностью гликозилирования в результате дополнительного процессинга их N-гликанов по сравнению с Fc-областью IgG1 дикого типа 30 (данные не представлены и см. также пример 14) и могут также обладать большей чувствительностью к агрегации, индуцированной условиями низкого рН (см., например, пример 20).

Так, авторы настоящего изобретения стремились создать улучшенный неактивирующий формат, который позволяет избегать наличия остаточной CDC-активности, может обеспечивать профиль гликозилирования, подобный дикому типу, и/или может быть более устойчивым к условиям низкого pH. При создании изобретения неожиданно было установлено, что объединение мутаций L234F, L235E и G236R (которые в настоящем описании обозначены также как формат FEA или FEA) в антителах IgG1-изотипа приводит к получению улучшенного инертного формата, который позволяет избегать возможной остаточной CDC-активности, обеспечивает профиль гликозилирования, подобный дикому типу, и обладает улучшенной устойчивостью к условиям низкого pH. Таким образом, при создании настоящего изобретения создан обладающий большими преимуществами новый дополнительный формат неактивирующего антитела, который является пригодным для клинической разработки и клинического применения. Как продемонстрировано в разделе "Примеры", указанный дополнительный неактивирующий формат, который можно применять не только для антител, но также, например, для слитых белков, можно рассматривать в качестве неактивирующего формата, лучшего в своем классе. Таким образом, в настоящем изобретении предложен новый инертный формат полипептидов, имеющих Fc-область человеческого IgG1, где указанная область имеет замены в положениях 234, 235 и 236, предпочтительно имеет замены F, E и R соответственно согласно Eu-нумерации. Указанный инертный формат является особенно ценным для моноспецифических и биспецифических антител. Указанный полипептид, например, моноспецифическое или биспецифическое антитело, которое имеет такие замены, указанные в изобретении, можно обозначать как имеющий неактивирующую Fc-область IgG1.

В случае биспецифических антител указанный инертный формат можно объединять также в гетеродимерном формате касательно замен, характерных для инертного формата, например, биспецифическое антитело может состоять из одной цепи, которая несет замены, характерные для инертного формата, предлагаемого в изобретении, а другая цепь может содержать другие замены, характерные для инертного формата, например, FEA. Таким образом, инертный формат, предлагаемый в изобретении, можно успешно применять для объединения, например, с существующими антителами-кандидатами, которые

уже прошли разработку для клинического применения, что избавляет от необходимости перепроектировать и повторять все необходимые анализы, позволяя быстро создавать биспецифические антитела с использованием таких технологий, как контролируемый обмен Fab-плечей.

5            Таким образом, одним из вариантов осуществления изобретения является белок, содержащий первый полипептид и второй полипептид, в котором  
указанные первый и второй полипептид каждый содержит по меньшей мере шарнирную область, СН<sub>2</sub>-участок и СН<sub>3</sub>-участок соответственно тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина IgG1, при этом по меньшей мере один из  
10            указанных первого и второго полипептидов является модифицированным и содержит замену аминокислот, соответствующую аминокислотам в положениях L234, L235 и G236, где положения аминокислот указаны в соответствии с Еу-  
нумерацией. Как указано, предпочтительно аминокислоты в положениях L234, L235 и G236 по меньшей мере в одном из указанных первом и втором  
15            полипептидах заменены на F, E и R соответственно.

              Другим вариантом осуществления изобретения является указанный белок, предлагаемый в изобретении, в котором один из первого и второго  
полипептидов содержит указанную замену аминокислот, которые соответствуют аминокислотам в положениях L234, L235 и G236, а другой является  
20            модифицированным и содержит замену аминокислот, которые соответствуют аминокислотам в положениях L234, L235 и D265, где предпочтительно  
указанные замены представляют собой F, E и A соответственно

              Следующим дополнительным вариантом осуществления изобретения является указанный белок, предлагаемый в изобретении, в котором и первый, и  
25            второй полипептиды содержат указанную замену аминокислот, которые соответствуют аминокислотам L234, L235 и G236.

              Должно быть очевидно, что белок, предлагаемый в изобретении, может представлять собой любой белок, для которого может быть ценным наличие Fc-  
области, которая является неактивирующей. Он может включать слитые белки, в  
30            которых, например, функциональный домен слит с Fc-областью, тем самым позволяя получать функциональный домен, например, с улучшенным временем полужизни в плазме.

Как указано выше, белки, предлагаемые в изобретении, предпочтительно содержат первую и вторую связывающие области. Приведенными в качестве примеров и предпочтительными белками, имеющими первую и вторую связывающие области, являются антитела, предлагаемые в изобретении.

5 Таким образом, в следующем дополнительном варианте осуществления изобретения белок представляет собой антитело, предлагаемое в изобретении. В следующем дополнительном варианте осуществления изобретения первый и второй полипептиды белка являются идентичными в белке или антителе, предлагаемом в изобретении. В другом варианте осуществления изобретения

10 указанные антитела, которые, как правило, могут иметь одинаковые связывающие домены, представляют собой моноспецифические антитела.

Указанные моноспецифические антитела в дальнейшем можно применять для создания биспецифического антитела, предлагаемого в изобретении.

15 Таким образом, в следующем дополнительном варианте осуществления изобретения белок, предлагаемый в изобретении, представляет собой биспецифическое антитело. Предпочтительно предложено биспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, в котором первый и второй полипептиды содержат дополнительные замены в указанных СН<sub>2</sub>- и СН<sub>3</sub>-участках соответственно, в результате последовательности СН<sub>2</sub>- и СН<sub>3</sub>-участков

20 соответственно из указанного первого и второго полипептидов являются различными, указанные замены позволяют получать указанный полипептид, содержащий указанный первый и второй полипептиды. Предпочтительные примеры указанных замен включают присутствие одного из первого и второго полипептидов, содержащего замену аминокислоты в положении F405 на L, и

25 другую замену в положении K409 на R. Альтернативно этому, под объем изобретения подпадают другие замены или способы, позволяющие получать гетеродимеры (т.е. объединение различных первого и второго полипептидов с получением биспецифического антитела).

30 Таким образом, одним из вариантов осуществления изобретения является способ получения биспецифического антитела, предлагаемого в изобретении, где указанный способ включает:

а) получение первого антитела, которое содержит

а. тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую по меньшей мере шарнирную область, СН2-участок и СН3-участок соответственно тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина IgG1, которая содержит замены аминокислот в положениях L234, L235 и G236 на F, E и R соответственно,

5 б. легкую цепь иммуноглобулина;

б) получение второго антитела, которое содержит

а. тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую по меньшей мере шарнирную область, СН2-участок и СН3-участок соответственно тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина IgG1, которая содержит замены аминокислот в

10 - положениях L234, L235 и D265, где предпочтительно указанные замены представляют собой F, E и A соответственно, или

- которая содержит замены аминокислот в положениях L234, L235 и G236 на F, E и R соответственно,

б. легкую цепь иммуноглобулина;

15 в) где последовательности указанных первого и второго СН3-участков указанных первого и второго антитела соответственно являются различными и представляют собой такие участки, для которых гетеродимерное взаимодействие между указанными первым и вторым СН3-участками является более сильным, чем каждое из гетеродимерных взаимодействий указанного первого и второго

20 СН3-участков;

г) инкубацию указанного первого антитела с указанным вторым антителом в восстанавливающих условиях, достаточных для того, чтобы цистеины в шарнирных областях подвергались изомеризации по дисульфидной связи; и

д) получение указанного биспецифического антитела, которое содержит

25 указанную первую иммуноглобулиновую тяжелую цепь и указанную первую иммуноглобулиновую легкую цепь указанного первого антитела, и указанную вторую иммуноглобулиновую тяжелую цепь и указанную вторую иммуноглобулиновую легкую цепь указанного второго антитела.

#### Краткое описание чертежей

30 На чертежах показано:

на фиг. 1 - данные о связывании мишеней вариантами антител к человеческому CD20. Представлены данные о связывании с CD20, присутствующим на клетках Raji, вариантами антител IgG1- и IgG4-изотипа,

несущими неактивирующие мутации в тяжелой цепи. Данные о связывании представлены в виде зависимости от концентрации антитела медианы MFI-PE (набор данных разделен на А и Б). Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM, полученные по четырем независимым повторностям.

5 Протестированные варианты представляли собой IgG1-FEA-K409R, IgG1-FER-K409R, IgG1-AAG-K409R, IgG1-RR-K409R, IgG1h2-S267K-K409R, IgG1-N297G-K409R, IgG1-AEASS-K409R, IgG1, IgG1-K409R, IgG1-b12, IgG4h2-S228P, IgG4-PAA, IgG4, IgG4-S228P где FEA: L234F-L235E-D265A, FER: L234F-L235E-G236R, AAG: L234A-L235A-P329G, RR: G236R-L328R, IgG1h2: E233P-L234V-L235A-G236del, AEASS: L234A-L235E-G237A-A330S-P331S, IgG4h2: E233P-F234V-L235A-G236del и PAA: S228P-F234A-L235A;

10 на фиг. 2 - данные о CDC в отношении клеток Raji, индуцированной вариантами антител к человеческому CD20, несущими неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи. CDC в отношении CD20-позитивных  
15 клеток Raji, индуцированную вариантами антител IgG1- и IgG4-изотипа, несущими неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, оценивали с использованием NHS (нормальная человеческая сыворотка) в качестве источника комплемента. Лизис клеток оценивали путем анализа процента PI-позитивных клеток с помощью проточной цитометрии. CDC  
20 представлена в виде площади под кривой (AUC), стандартизированной относительно несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и IgG1 дикого типа (100%). Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM, полученные по трем независимым повторностям. Протестированные варианты представляли собой IgG1-FEA-K409R, IgG1-FER-K409R, IgG1-AAG-K409R,  
25 IgG1-RR-K409R, IgG1h2-S267K-K409R, IgG1-N297G-K409R, IgG1-AEASS-K409R, IgG1, IgG1-K409R, IgG1-b12, IgG4h2-S228P, IgG4-PAA, IgG4, IgG4-S228P, где FEA: L234F-L235E-D265A, FER: L234F-L235E-G236R, AAG: L234A-L235A-P329G, RR: G236R-L328R, IgG1h2: E233P-L234V-L235A-G236del, AEASS: L234A-L235E-G237A-A330S-P331S, IgG4h2: E233P-F234V-L235A-G236del и PAA: S228P-F234A-L235A;

30 на фиг. 3 - данные о связывании C1q вариантами антител к человеческому CD20, несущими неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи. Данные о связывании представлены в виде зависимости от концентрации

антитела медианы MFI-FITC. Данные представляют собой средние значения ( $\pm$  SD), полученные по трем независимым измерениям в одном эксперименте.

Протестированные варианты представляли собой IgG1-FEA-K409R, IgG1-FER-K409R, IgG1, IgG1-b12, где FEA: L234F-L235E-D265A и FER: L234F-L235E-G236R;

на фиг. 4 - данные о CDC в отношении клеток Raji, индуцированной вариантами антител к человеческому CD20, несущими неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи. CDC в отношении клеток Raji, индуцированную вариантами антител IgG1-HLA-DR-4 (A) и IgG1-HLA-DR-1D09C3 (B), несущими неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, а также таргетирующим HLA-DR F(ab')<sub>2</sub>-фрагментом, оценивали с помощью анализа *in vitro* CDC с использованием NHS в качестве источника комплемента. Лизис клеток оценивали путем анализа процента PI-позитивных клеток с помощью проточной цитометрии. CDC представлена в виде площади под кривой (AUC), стандартизованной относительно антитела IgG1-изотипа, несущего мутацию K409R (IgG1-K409R, 100%). Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM, полученные по пяти (дикий тип и варианты L234F-L235E-D265A-K409R) или двум (варианты L234F-L235E-G236R-K409R или F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент) независимым повторностям. Протестированные варианты представляли собой IgG1-FEA-K409R, IgG1-FER-K409R, IgG1-K409R, F(ab')<sub>2</sub>, где FEA: L234F-L235E-D265A и FER: L234F-L235E-G236R;

на фиг. 5 - данные о захвате вариантов антител к человеческому CD20 IgG1- и IgG4-изотипа на планшетах для ELISA. Представлены данные об иммобилизации вариантов IgG1 и IgG4 с неактивирующими мутациями в константной области тяжелой цепи с помощью F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов античеловеческого IgG на планшетах для ELISA. Данные о связывании представлены в виде площади под кривой (AUC), стандартизованной относительно IgG1 дикого типа (100%). Данные представляют собой средние значения ( $\pm$  SEM), полученные по трем независимым повторностям. Детекцию осуществляли, используя античеловеческий IgG-Fc $\gamma$ -HRP и ABTS. Протестированные варианты представляли собой IgG1-FEA-K409R, IgG1-FER-K409R, IgG1-AAG-K409R, IgG1-RR-K409R, IgG1h2-S267K-K409R, IgG1-N297G-K409R, IgG1-AEASS-K409R, IgG1, IgG1-K409R, IgG4h2-S228P, IgG4-PAA, IgG4,

IgG4-S228P, где FEA: L234F-L235E-D265A, FER: L234F-L235E-G236R, AAG: L234A-L235A-P329G, RR: G236R-L328R, IgG1h2: E233P-L234V-L235A-G236del, AEASS: L234A-L235E-G237A-A330S-P331S, IgG4h2: E233P-F234V-L235A-G236del и PAA: S228P-F234A-L235A;

5 на фиг. 6 - данные о связывании вариантов антител к человеческому CD20 IgG1- и IgG4-изотипа, несущих неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, с FcγRIa, FcγRIIa (аллотипы 131H и 131R), FcγRIIb и FcγRIIIa (аллотипы 158F и 158V). Связывание иммобилизованных вариантов IgG1 и IgG4 с неактивирующими мутациями с мономерными и димерными мечеными с  
10 помощью His биотинилированными внеклеточными доменами (ECD) FcγRIa (A), FcγRIIa аллотипа 131H (Б), FcγRIIa аллотипа 131R (В), FcγRIIb (Г), FcγRIIIa аллотипа 158F (Д) и FcγRIIIa аллотипа 158V (F) оценивали с помощью анализов ELISA. Данные о связывании представлены в виде площади под кривой (AUC), стандартизированной относительно IgG1 дикого типа (100%). Данные  
15 представляют собой средние значения ( $\pm$  SEM), полученные по трем независимым повторностям. Детекцию осуществляли, используя стрептавидин-полиHRP и ABTS. Протестированные варианты представляли собой IgG1-FEA-K409R, IgG1-FER-K409R, IgG1-AAG-K409R, IgG1-RR-K409R, IgG1h2-S267K-K409R, IgG1-N297G-K409R, IgG1-AEASS-K409R, IgG1, IgG1-K409R, IgG4h2-  
20 S228P, IgG4-PAA, IgG4, IgG4-S228P, где FEA: L234F-L235E-D265A, FER: L234F-L235E-G236R, AAG: L234A-L235A-P329G, RR: G236R-L328R, IgG1h2: E233P-L234V-L235A-G236del, AEASS: L234A-L235E-G237A-A330S-P331S, IgG4h2: E233P-F234V-L235A-G236del и PAA: S228P-F234A-L235A;

на фиг. 7 - данные об активации FcγR вариантами антител к человеческому  
25 CD20 IgG1- и IgG4-изотипа, несущими неактивирующие мутации в области тяжелой цепи, измеренной с использованием экспрессирующих мишень клеток Raji и экспрессирующих FcR репортерных клеток. (А-Е) - данные об активации репортерных клеточных линий Jurkat, стабильно экспрессирующих либо (А) FcγRIa, (Б) FcγRIIa аллотипа 131H, (В) FcγRIIa аллотипа 131R, (Г) FcγRIIb, (Д)  
30 FcγRIIIa аллотипа 158F, либо (Е) FcγRIIIa аллотипа 158V, измеренные по уровню люминесценции (RLU) после совместного культивирования с клетками Raji, экспрессирующими CD20, и с различными концентрациями вариантов антител IgG1- и IgG4-изотипа. Данные об активации представлены в виде

площади по кривой (AUC), стандартизованной относительно не связывающегося контрольного IgG1-b12 (0%) и IgG1 дикого типа (100%), в каждой экспериментальной повторности. Данные представляют собой средние значения ( $\pm$  SEM), полученные по трем независимым экспериментальным

5 повторностям. Протестированные варианты представляли собой IgG1-FEA-K409R, IgG1-FER-K409R, IgG1-AAG-K409R, IgG1-RR-K409R, IgG1h2-S267K-K409R, IgG1-N297G-K409R, IgG1-AEASS-K409R, IgG1, IgG1-K409R, IgG1-b12, IgG4h2-S228P, IgG4-PAA, IgG4, IgG4-S228P, где FEA: L234F-L235E-D265A, FER: L234F-L235E-G236R, AAG: L234A-L235A-P329G, RR: G236R-L328R,

10 IgG1h2: E233P-L234V-L235A-G236del, AEASS: L234A-L235E-G237A-A330S-P331S, IgG4h2: E233P-F234V-L235A-G236del и PAA: S228P-F234A-L235A;

на фиг. 8 - данные о ADCC, индуцированной вариантами антител к человеческому CD20 IgG1- и IgG4-изотипа, несущими неактивирующие мутации в области тяжелой цепи, измеренные с использованием анализа цитотоксичности DELFIA<sup>®</sup> EuTDA TRF. (А-Б) Опосредуемую NK-клетками ADCC измеряли по

15 уровню высвобождения реагента EuTDA из меченных BATDA экспрессирующих CD20 клеток Raji при совместной инкубацией с мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC) и вариантами антител к человеческому CD20 IgG1- и IgG4-изотипа. Для некоторых вариантов ADCC представлена (А) в виде

20 площади под кривой (AUC), стандартизованной относительно несвязывающегося контрольного IgG1-b12 (0%) и IgG1 дикого типа (100%), в каждой экспериментальной повторности. Данные представляют собой средние значения ( $\pm$  SEM), полученные по четырем (дикий тип и варианты K409R) или двум (варианты L234F-L235E-D265A-K409R и L234F-L235E-G236R-K409R)

25 независимым повторностям. Для некоторых вариантов ADCC представлена (Б) в виде процента лизиса при концентрации антител 10 мкг/мл относительно несвязывающегося контрольного IgG1-b12 (0%) и IgG1 дикого типа (100%), в каждой экспериментальной повторности. Данные представляют собой средние значения ( $\pm$  SEM), полученные для шести доноров в двух независимых

30 экспериментах. Протестированные варианты представляли собой IgG1-FEA-K409R, IgG1-FER-K409R, IgG1-AAG-K409R, IgG1-RR-K409R, IgG1h2-S267K-K409R, IgG1-N297G-K409R, IgG1-AEASS-K409R, IgG1, IgG1-K409R, IgG1-b12, IgG4h2-S228P, IgG4-PAA, IgG4, IgG4-S228P, где FEA: L234F-L235E-D265A,

FER: L234F-L235E-G236R, AAG: L234A-L235A-P329G, RR: G236R-L328R,  
IgG1h2: E233P-L234V-L235A-G236del, AEASS: L234A-L235E-G237A-A330S-  
P331S, IgG4h2: E233P-F234V-L235A-G236del и PAA: S228P-F234A-L235A;

на фиг. 9 - данные об активации Т-клеток вариантами антител к  
5 человеческого CD3 IgG1- и IgG4-изотипа, несущими неактивирующие мутации  
в константной области тяжелой цепи. (А-Б) Данные о повышающей регуляции  
экспрессии CD69 (полученные с помощью метода проточной цитометрии) в  
качестве показателя ранней активации Т-клеток, на Т-клетках в совместной  
культуре PBMC, индуцированной вариантами антител к человеческому CD3  
10 IgG1- и IgG4-изотипа, несущими указанные мутации. Данные о повышающей  
регуляции CD69 представлены в виде (А) зависимости от дозы процента CD69<sup>+</sup>  
Т-клеток (CD28<sup>+</sup>) или в виде (Б) площади под кривой дозовой зависимости  
(AUC), стандартизированной относительно варианта антитела дикого типа IgG1-  
F405L (100%) для каждого донора и каждой экспериментальной повторности.  
15 Данные представляют собой средние значения ( $\pm$  SEM), полученные по 3  
независимым экспериментальным повторностям (2 независимых донора на  
каждую экспериментальную повторность). Протестированные варианты  
представляли собой IgG1-FEA-F405L, IgG1-FER-F405L, IgG1-AAG-F405L, IgG1-  
RR-F405L, IgG1h2-S267K-F405L, IgG1-N297G-F405L, IgG1-AEASS-F405L,  
20 IgG1-F405L, IgG4h2-S228P-F405L-R409K, IgG4-PAA-F405L-R409K, IgG4-S228P,  
где FEA: L234F-L235E-D265A, FER: L234F-L235E-G236R, AAG: L234A-L235A-  
P329G, RR: G236R-L328R, IgG1h2: E233P-L234V-L235A-G236del,  
AEASS: L234A-L235E-G237A-A330S-P331S, IgG4h2: E233P-F234V-L235A-  
G236del и PAA: S228P-F234A-L235A;

25 на фиг. 10 - данные об опосредуемой Т-клетками цитотоксичности *in vitro*,  
индуцированной неактивирующими вариантами биспецифических антител. (А-  
В) Опосредуемую Т-клетками цитотоксичность в отношении HER2-позитивных  
клеток SK-OV-3 в совместной культуре PBMC оценивали, используя варианты  
биспецифических антител CD3xHER2 (А), CD3xb12 (Б; не связывается с  
30 клеткой-мишенью) или b12xHER2 (В; не связывается с Т-клетками), несущими  
неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, с помощью  
красителя Alamar blue. Абсорбцию при 590 нм измеряли с помощью планшет-  
ридера Envision и процент жизнеспособных клеток рассчитывали для каждого

донора и каждой экспериментальной повторности, при этом в качестве 100%-ной цитотоксичности принимали цитотоксичность, обнаруженную для обработанных стауроспорином клеток, а в качестве 0%-ной цитотоксичности принимали цитотоксичность, обнаруженную при использовании представляющей собой контроль среды (без антитела, без РВМС). Данные представлены в виде кривой дозовой зависимости относительно % жизнеспособных клеток SK-OV-3. Данные представляют собой средние значения ( $\pm$  SEM), полученные по 3 независимым экспериментальным повторностям (2 независимых донора на каждую экспериментальную повторность).

10 Протестированные варианты представляли собой BisG1 F405LxK409R, BisG1 FEA-F405LxFEА-K409R, BisG1 FER-F405LxFER-K409R, BisG1 AAG-F405LxAAG-K409R, BisG1 RR-F405LxRR-K409R, BisG1lh2 S267K-F405LxS267K-K409R, BisG4lh2 S228P-F405L-R409KxS228P, BisG1 N297G-F405LxN297G-K409R, BisG1 AEASS-F405LxAEASS-K409R, BisG4 PAA-F405L-R409KxPAA, где FEA: L234F-L235E-D265A, FER: L234F-L235E-G236R, AAG: L234A-L235A-P329G, RR: G236R-L328R, G1lh2: E233P-L234V-L235A-G236del, AEASS: L234A-L235E-G237A-A330S-P331S, G4lh2: E233P-F234V-L235A-G236del и PAA: S228P-F234A-L235A;

на фиг. 11 - общие концентрации человеческого IgG (hIgG), измеренные в образцах крови, собранной у мышей, которым инъецировали варианты антител IgG1-изотипа к человеческому CD20 или IgG1-изотипа к человеческому CD3 (huCLB-T3/4). (А) Общая концентрация hIgG в образцах крови, собранных у мышей, которым инъецировали IgG1 к человеческому CD20 дикого типа, IgG1-CD20-K409R, IgG1-CD20-L234F-L235E-D265A-K409R и IgG1-CD20-L234F-L235E-G236R-K409R, в различные моменты времени после инъекции. Данные представляют собой средние значения ( $\pm$  SEM), полученные для 3 мышей на группу, за исключением IgG1-FER-K409R (2 мыши). (Б) Общая концентрация hIgG в образцах крови, собранных у мышей, которым инъецировали IgG1 к человеческому CD23 дикого типа, IgG1-CD3-F405L, IgG1-CD3-L234F-L235E-D265A-F405L и IgG1-CD3-L234F-L235E-G236R-F405L, в различные моменты времени после инъекции. Данные представляют собой средние значения ( $\pm$  SEM), полученные для 3 мышей на группу. (В) Клиренс вплоть до дня 21 после введения антитела определяли согласно формуле  $D \times 1000 / AUC$ , где D обозначает

инъецированную дозу, а AUC обозначает, площадь под кривой зависимости концентрации от времени. На всех чертежах пунктирной линией обозначена прогнозируемая концентрация IgG1 в зависимости от времени для антител IgG1 дикого типа у SCID-мышей. Данные получали для трех мышей на группу за исключением IgG1-FER-K409R (2 мыши). Протестированные варианты представляли собой IgG1-FEA-K409R, IgG1-FER-K409R, IgG1-K409R, IgG1-FEA-F405L, IgG1-FER-F405L, IgG1-F405L, IgG1, где FEA: L234F-L235E-D265A и FER: L234F-L235E-G236R;

на фиг. 12 - схематические изображения различных видов гликанов, обнаруженных на вариантах антител IgG1-изотипа, протестированных в примере 14;

на фиг. 13 - данные об эффективности контролируемого обмена Fab-плечей (сFAE) для создания вариантов bsАт. Биспецифические антитела (обозначены как BisG1) создавали с помощью метода сFAE, в котором одно моноспецифическое антитело (обозначено как IgG1-A) несет мутацию F405L, а другое моноспецифическое антитело (обозначено как IgG1-B) несет мутацию K409R. Эффективность сFAE для создания вариантов bsАт оценивали для вариантов, в которых (А; 20 экспериментальных точек) оба моноспецифических антитела несут неактивирующие мутации L234F-L235E-G236R (FER) в дополнение к мутациям F405L и K409R (Б; 16 экспериментальных точек) первое моноспецифическое антитело несет мутации L234F-L235E-G236R (FER) в дополнение в мутации F405L, а второе моноспецифическое антитело несет мутации L234F-L235E-D265A (FEA) в дополнение к мутации K409R, (В; 12 экспериментальных точек) первое моноспецифическое антитело несет мутации L234F-L235E-D265A (FEA) в дополнение к мутации F405L, а второе моноспецифическое антитело несет мутации L234F-L235E-G236R (FER) в дополнение к мутации K409R. Представлен процент (%) bsАт или остаточных количеств вариантов моноспецифического антитела (IgG1-A или IgG1-B), который определяли с использованием масс-спектрометра со специальной ионной ловушкой (Orbitrap) Q-Exactive Plus. FEA:L234F-L235E-D265A и FER: L234F-L235E-G236R;

на фиг. 14 - уровни производства вариантов антител, несущих неактивирующие мутации либо L234F-L235E-G236R (FER), либо L234F-L235E-

D265A (FEA) в константной области тяжелой цепи в дополнение к либо F405L, либо K409R. Варианты антител получали в клетках Expi293F. Титр полученных антител представлен в мг/л на точечном графике с указанием средних значений ( $\pm$  SEM). Каждая точка представляет данные о выходе продукта в виде

5 конкретного клона антитела (средние значения, если для этого конкретного клона было доступно большее количество данных о производстве), содержащего указанные мутации. Для осуществления сравнения представлены титры полученных соответствующих клонов вариантов антитела L234F-L235E-D265A-F405L (FEA-F405L; незакрашенные кружки) и вариантов антитела L234F-L235E-

10 G236R-F405L (FER-F405L; закрашенные кружки). Аналогично этому, представлены полученные титры соответствующих клонов вариантов антитела L235E-D265A-K409R (FEA-K409R, незакрашенные квадраты) и вариантов антитела L234F-L235E-G236R-K409R (FER-K409R, закрашенные квадраты);

на фиг. 15 - приведенное в качестве примера схематическое изображение

15 моноспецифического антитела (А) и биспецифического антитела (Б). (А) Тяжелые цепи обозначены черным цветом; легкие цепи обозначены белым цветом. Индивидуальные домены тяжелой и легкой цепей антитела обозначены как  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  и  $V_H$  (константные домены тяжелой цепи (H1, H2, H3) и переменные домены тяжелой цепи (VH)),  $C_L$  и  $V_L$  ( $C_L$ ,  $V_L$ , константные и переменные домены легкой цепи). (Б) Биспецифическое антитело, состоящее из 2 полумолекул (1 полумолекула представлена в виде обозначенных черным и белым цветом тяжелых и легких цепей соответственно; 1 полумолекула представлена в виде тяжелых и легких цепей, обозначенных полосатым узором), такое как полученное посредством контролируемого обмена Fab-плечей, с двумя

20 различными специфичностями Fab-плечей. Показаны шарнирная область, Fab-плечи и Fc-домен;

на фиг. 16 - данные о связывании C1q вариантами антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа, несущими неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи. Данные о связывании представлены в виде площади под кривой

30 (AUC), стандартизованной относительно несвязывающего контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и антитела дикого типа IgG1-CD20 (100%). Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM, полученные по 3 независимым экспериментам. Протестированные варианты представляли собой IgG1-CD20

дикого типа (IgG1) и его варианты IgG1-FEA-F405L, IgG1-FEA-K409R, IgG1-FER-F405L, IgG1-FER-K409R, BisG1 FEA-F405LxFEA-K409R, BisG1 FER-F405LxFER-K409R, BisG1 FEA-F405LxFER-K409R, BisG1 FER-F405LxFEA-K409R, где FER: L234F-L235E-G236R и FEA: L234F-L235E-D265A;

5 на фиг. 17 - данные о CDC в отношении клеток Raji, индуцированной вариантами антител к человеческому CD20, несущими неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи. CDC в отношении клеток CD20-  
10 позитивных клеток Raji, индуцированную вариантами антител IgG1-CD20, несущими неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, оценивали с использованием NHS в качестве источника комплемента. Лизис  
15 клеток оценивали путем анализа процента PI-позитивных клеток с помощью проточной цитометрии. CDC представлена в виде площади под кривой (AUC), стандартизированной относительно несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%) и антитела дикого типа IgG1-CD20 (100%). Данные представляют  
20 собой средние значения  $\pm$  SEM, полученные по 3 независимым экспериментам. Протестированные варианты представляли собой IgG1-CD20 дикого типа (IgG1) и его варианты IgG1-FEA-F405L, IgG1-FEA-K409R, IgG1-FER-F405L, IgG1-FER-K409R, BisG1 FEA-F405LxFEA-K409R, BisG1 FER-F405LxFER-K409R, BisG1 FER-F405LxFEA-K409R, BisG1 FEA-F405LxFER-K409R, где FER: L234F-L235E-G236R и FEA: L234F-L235E-D265A;

на фиг. 18 - данные об опосредуемой Т-клетками цитотоксичности *in vitro*, индуцированной неактивными вариантами биспецифических антител. (А-Б) С  
использованием Alamar blue оценивали опосредуемую Т-клетками  
25 цитотоксичность в отношении HER2-позитивных клеток SK-OV-3 в совместной культуре РВМС, используя варианты биспецифических антител CD3xHER2 (А) или CD3xb12 (Б; без связывания с клеткой-мишенью), несущие асимметричные неактивирующие мутации в Fc-области. Абсорбцию при 590 нм измеряли с  
30 помощью планшет-ридера Envision и процент жизнеспособных клеток рассчитывали для каждого донора и каждой экспериментальной повторности, при этом в качестве 100%-ной цитотоксичности принимали цитотоксичность, обнаруженную для обработанных стауроспорином клеток, а в качестве 0%-ной цитотоксичности принимали цитотоксичность, обнаруженную при использовании представляющей собой контроль среды (без антитела, без

РВМС). Данные представлены в виде кривой дозовой зависимости относительно % жизнеспособных клеток SK-OV-3. Данные представляют собой средние значения ( $\pm$  SEM), полученные по 3 независимым экспериментальным повторностям (2 независимых донора на каждую экспериментальную повторность). Протестированные варианты биспецифических антител CD3xHER2 и CD3xb12 представляли собой BisG1 F405LxK409R, BisG1 FER-F405LxK409R, BisG1 FER-F405LxFEА-K409R, BisG1 FER-F405LxAAG-K409R и BisG1 FER-F405LxN297G-K409R, где FER: L234F-L235E-G236R, FEА: L234F-L235E-D265A и AAG: L234A-L235A-P329G;

на фиг. 19 - данные об активации Т-клеток неактивирующими вариантами биспецифических антител CD3xHER2. Оценивали повышающую регуляцию экспрессии CD69 (измеренную методом проточной цитометрии) в качестве показателя ранней активации Т-клеток, на Т-клетках в совместной культуре человеческих РВМС, используя вариант биспецифического антитела CD3xHer2, напоминающий антитело дикого типа, и его варианты, несущие указанные симметричные или несимметричные неактивирующие мутации в Fc-области. Повышающая регуляция CD69 представлена в виде площади под кривой дозой зависимости (AUC), стандартизованной относительно величины AUC, установленной для несвязывающегося отрицательного контроля IgG1-b12 (0%) и варианта биспецифического антитела, напоминающего IgG1 дикого типа (BisG1 F405LxK409R, 100%) для каждого донора и каждой экспериментальной повторности. Данные представляют собой средние значения ( $\pm$  SEM), полученные для четырех доноров в двух независимых экспериментах (по 2 донора на каждый независимый эксперимент). Протестированные варианты биспецифического антитела CD3xHER2 представляли собой BisG1 F405LxK409R, BisG1 FER-F405LxK409R, BisG1 FER-F405LxFEА-K409R, BisG1 FER-F405LxAAG-K409R и BisG1 FER-F405LxN297G-K409R, где FER: L234F-L235E-G236R, FEА: L234F-L235E-D265A и AAG: L234A-L235A-P329G;

на фиг. 20 - данные о CDC в отношении клеток Raji, индуцированной вариантами антител к человеческому CD20, несущими неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, которую оценивали с помощью анализа *in vitro* CDC с использованием NHS в качестве источника комплемента. Способность индуцировать CDC сравнивали между вариантами, которые

получали таким образом, что они либо содержали, либо не содержали С-концевой лизин в константной области тяжелой цепи. Лизис клеток оценивали путем анализа процента PI-позитивных клеток с помощью проточной цитометрии. CDC представлена в виде площади под кривой (AUC),

5 стандартизованной относительно антитела дикого типа IgG1-CD20 (IgG1; 100%) и контрольных образцов без антитела (0%). Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM, полученные по 3 независимым экспериментам.

Протестированные варианты представляли собой IgG1, IgG1-delK, IgG1-FEA, IgG1-FEA-delK, IgG1-FER, IgG1-FER-delK, где FEA: L234F-L235E-D265A, FER: L234F-L235E-G236R, delK: рекомбинантная делеция в HC С-концевого лизина;

10 на фиг. 21 - данные об активации человеческого Fc $\gamma$ R вариантами антител к человеческому CD20, несущими неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, полученные с использованием экспрессирующих мишень клеток Raji и экспрессирующих Fc $\gamma$ R репортерных клеток. Способность индуцировать активацию Fc $\gamma$ R сравнивали между вариантами, которые получали

15 таким образом, что они либо содержали, либо не содержали С-концевой лизин в константной области тяжелой цепи. (А-Г) Данные об активации репортерных клеточных линий Jurkat, стабильно экспрессирующих либо (А) Fc $\gamma$ RIa, (Б) Fc $\gamma$ RIIa аллотипа 131H, (В) Fc $\gamma$ RIIb, либо (Г) Fc $\gamma$ RIIIa аллотипа 158V, измеренные по уровню люминесценции после совместного культивирования с

20 клетками Raji, экспрессирующими CD20, и с различными концентрациями вариантов антител IgG1-CD20 или IgG1-CD20-delK. Данные об активации представлены в виде площади по кривой (AUC), стандартизованной относительно несвязывающегося контрольного IgG1-b12 (0%) и IgG1 дикого

25 типа (100%), в каждой экспериментальной повторности. Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM, полученные по 2 независимым повторностям. Протестированные варианты представляли собой IgG1, IgG1-delK, IgG1-FEA, IgG1-FEA-delK, IgG1-FER, IgG1-FER-delK, где FEA: L234F-L235E-D265A, FER: L234F-L235E-G236R, delK: рекомбинантная делеция в HC С-концевого лизина;

30 на фиг. 22 - данные о CDC в отношении клеток Raji, индуцированной аллотипическими вариантами антитела против человеческого CD20 IgG1-изотипа дикого типа и их вариантами, несущими неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, которую оценивали с помощью анализа *in*

*in vitro* CDC с использованием NHS в качестве источника комплемента. Лизис клеток оценивали путем анализа процента PI-позитивных клеток с помощью проточной цитометрии. CDC представлена в виде площади под кривой (AUC), стандартизованной относительно антитела к человеческому CD20 (аллотип IgG1(f); 100%) и контрольных образцов без антитела (0%). Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM, полученные по трем независимым экспериментам. Протестированные варианты представляли собой IgG1(fa), IgG1(zax), IgG1(zav), IgG1(za) и IgG1(f), где FEA: L234F-L235E-D265A, FER: L234F-L235E-G236R;

на фиг. 23 - данные об активации человеческого Fc $\gamma$ R вариантами антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа, несущими неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи различных аллотипических вариантов IgG1, полученные с использованием экспрессирующих мишень клеток Raji и экспрессирующих Fc $\gamma$ R репортерных клеток. (А-Г) Данные об активации репортерных клеточных линий Jurkat, стабильно экспрессирующих либо (А) Fc $\gamma$ RIa, (Б) Fc $\gamma$ RIIa аллотипа 131H, (В) Fc $\gamma$ RIIb, либо (Г) Fc $\gamma$ RIIIa аллотипа 158V, измеренные по уровню люминесценции после совместного культивирования с клетками Raji, экспрессирующими CD20, и с различными концентрациями вариантов антител IgG1-CD20. Данные об активации представлены в виде площади под кривой (AUC), стандартизованной относительно несвязывающегося контрольного IgG1-b12 (0%) и IgG1 дикого типа (100%), в каждой экспериментальной повторности. Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM, полученные по 2 независимым повторностям. Протестированные варианты представляли собой IgG1(f), IgG1(za), IgG1(zav), IgG1(zax), IgG1(fa) и их варианты, несущие мутации FER или FEA, где FER: L234F-L235E-G236R и FEA: L234F-L235E-D265A;

на фиг. 24 - данные о CDC в отношении клеток Raji, индуцированной вариантами подклассов антител против человеческого CD20 дикого типа и их вариантами, несущими неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, которую оценивали с помощью анализа *in vitro* CDC с использованием NHS в качестве источника комплемента. (А) Данные о CDC, индуцированной антителами к CD20 дикого типа IgG1- и IgG3-изотипа (аллотипы IGHG3\*01 [IgG3] и IGHG3\*04 [IgG3rch2]) и их неактивирующими

вариантами. (Б) Данные о CDC, индуцированной антителами к CD20 дикого типа IgG1- и IgG4-изотипа и их неактивирующими вариантами. Лизис клеток оценивали путем анализа процента PI-позитивных клеток с помощью проточной цитометрии. CDC представлена в виде площади под кривой (AUC),

5 стандартизованной относительно антитела к человеческому CD20 дикого типа IgG1-изотипа; (IgG1; 100%) и контрольных образцов без антитела (0%). Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM, полученные по трем независимым экспериментам. FEA: L234F-L235E-D265A, FER: L234F-L235E-G236R, EA: L235E-D265A и ER: L235E-G236R;

10 на фиг. 25 - данные об активации человеческого Fc $\gamma$ R вариантами антител к человеческому CD20 IgG1-, IgG3- и IgG4-изотипа, несущими неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, полученные с использованием экспрессирующих мишень клеток Raji и экспрессирующих Fc $\gamma$ R репортерных клеток. (А-Г) Данные об активации репортерных клеточных линий Jurkat, стабильно экспрессирующих либо (А) Fc $\gamma$ RIa, (Б) Fc $\gamma$ RIIa аллотипа 131H, (В) Fc $\gamma$ RIIb, либо (Г) Fc $\gamma$ RIIIa аллотипа 158V, измеренные по уровню люминесценции после совместного культивирования с клетками Raji, экспрессирующими CD20, и с различными концентрациями вариантов антител IgG1-CD20. Данные об активации представлены в виде площади под кривой (AUC), стандартизованной относительно несвязывающегося контрольного IgG1-b12 (0%) и IgG1 дикого типа (100%), в каждой экспериментальной повторности. Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM, полученные по 2 независимым повторностям. Протестированные варианты представляли собой IgG1, IgG3 (IGHG3\*01), IgG3rch2 (IGHG3\*04), IgG4 и их варианты, несущие мутации ER, EA, FER или FEA, где ER: L235E-G236R, EA: L235E-D265A, FER: L234F-L235E-G236R и FEA: L234F-L235E-D265A;

на фиг 26 - данные об активации человеческого Fc $\gamma$ R вариантами мышиных антител против человеческого CD20 IgG2a-изотипа, несущими неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, полученные с использованием экспрессирующих мишень клеток Raji и экспрессирующих Fc $\gamma$ R репортерных клеток. (А-Г) Данные об активации репортерных клеточных линий Jurkat, стабильно экспрессирующих либо (А) Fc $\gamma$ RIa, (Б) Fc $\gamma$ RIIa аллотипа 131H, (В) Fc $\gamma$ RIIb, либо (Г) Fc $\gamma$ RIIIa аллотипа 158V, измеренные по уровню

люминесценции после совместного культивирования с клетками Raji, экспрессирующими CD20, и с различными концентрациями вариантов мышиных антител IgG2a-CD20. Данные об активации представлены в виде площади под кривой (AUC), стандартизованной относительно несвязывающегося контрольного IgG2a-b12 (0%) и IgG2a дикого типа (100%), в каждой экспериментальной повторности. Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM, полученные по 2 независимым повторностям. Протестированные варианты представляли собой IgG2a, IgG2a-FER, IgG2a-LALA и IgG2a-LALAPG, где FER: L234F-L235E-G236R, LALA: L234A-L235A и LALAPG: L234A-L235A-P329G;

на фиг. 27 - данные о связывании C1q вариантами мышиных антител против человеческого CD20 IgG2a-изотипа, несущими неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, после опсонизации CD20-позитивных клеток Raji нормальной человеческой сывороткой (NHS) в качестве источника C1q. Данные о связывании представлены в виде площади под кривой (AUC), стандартизованной относительно несвязывающегося контрольного антитела IgG2a-b12 (0%) и мышиного антитела дикого типа IgG2a-CD20 (100%). Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM, полученные по 3 независимым экспериментам. Протестированные варианты антител представляли собой IgG2a дикого типа, IgG2a-FER, IgG2a-LALA и IgG2a-LALAPG, где FER: L234F-L235E-G236R, LALA: L234A-L235A и LALAPG: L234A-L235A-P329G;

на фиг. 28 - данные о CDC в отношении клеток Raji, индуцированной вариантами мышиных антител против человеческого CD20 IgG2a-изотипа, несущими неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи. CDC в отношении CD20-позитивных клеток Raji, индуцированную вариантами антитела IgG2a-CD20, несущими неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, оценивали с использованием нормальной человеческой сыворотки (NHS) в качестве источника комплемента. Лизис клеток оценивали путем анализа процента PI-позитивных клеток с помощью проточной цитометрии. CDC представлена в виде площади под кривой (AUC), стандартизованной относительно не связывающегося контрольного антитела IgG2a-b12 (0%) и мышиного антитела IgG2a-CD20 дикого типа (100%). Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM, полученные по трем независимым

повторностям. Протестированные варианты антител представляли собой IgG2a дикого типа, IgG2a-FER, IgG2a-LALA и IgG2a-LALAPG, где FER: L234F-L235E-G236R, LALA: L234A-L235A и LALAPG: L234A-L235A-P329G.

Подробное описание изобретения

- 5 Как указано в настоящем описании, установлено, что специфические модификации в аминокислотных положениях в Fc-области антитела представляют собой неактивирующие модификации, делающими белок в основном инертным в отношении функции Fc, в то же время обладая ценными свойствами с точки зрения производства.
- 10 В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие "неактивирующий" относится к ингибированию или аннулированию взаимодействия белка, предлагаемого в изобретении, с Fc-рецепторами (FcR), присутствующими на широком разнообразии эффекторных клеток, таких как моноциты, или взаимодействия с C1q, приводящего к активации пути
- 15 комплемента. В контексте настоящего описания понятие "неактивирующий" включает пониженную CDC-активность, пониженное C1q-связывание, пониженную ADCC, пониженное связывание или отсутствие связывания с человеческими FcγRIa, FcγRIIa(H), FcγRIIa(R), FcγRIIb, FcγRIIIa(F) и FcγRIIIa(V), пониженную активацию и передачу сигналов или отсутствие
- 20 активации и передачи сигналов через человеческие FcγRIa, FcγRIIa(H), FcγRIIa(R), FcγRIIb, FcγRIIIa(F) и FcγRIIIa(V). Понятие "неактивирующий" включает также отсутствие индукции Т-клеточной активации при применении в контексте таргетинга CD3 (например, при применении моноспецифических антител, таргетирующих CD3, или в контексте применения биспецифических
- 25 или мультиспецифических антител независимым от опухолеассоциированного антигена образом). Должно быть очевидно, что указанные "неактивирующие" особенности предпочтительно оценивать относительно белка, который не является "неактивирующим", например, сравнивая антитело, имеющее немодифицированную Fc-область, обладающую функциональностью, подобной
- 30 дикому типу, с модифицированной Fc-областью, предлагаемой в изобретении, такой как указана в настоящем описании. В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие "Fc-область" относится к области, которая

содержит в направлении от N-конца к C-концу по меньшей мере шарнирную область, СН<sub>2</sub>-участок и СН<sub>3</sub>-участок.

В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие "белок" относится к крупным биологическим молекулам, которые содержат одну или несколько цепей аминокислот, ковалентно связанных друг с другом. Указанное соединение может осуществляться через пептидную связь и/или дисульфидный мостик. Индивидуальную цепь аминокислот можно обозначать также понятием "полипептид". Таким образом, белок в контексте настоящего изобретения может состоять из одного или нескольких полипептидов. Белок, предлагаемый в изобретении, может представлять собой любой тип белка, такой как антитело или вариант родительского антитела, или слитый белок.

В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие "антитело" относится к молекуле иммуноглобулина, фрагменту молекулы иммуноглобулина или производному любого из них, которое обладает способностью специфически связываться с антигеном в типичных физиологических условиях со временем полужизни, которое соответствует требуемым периодам времени, таким как по меньшей мере примерно 30 мин, по меньшей мере примерно 45 мин, по меньшей мере примерно 1 ч, по меньшей мере примерно 2 ч, по меньшей мере примерно 4 ч, по меньшей мере примерно 8 ч, по меньшей мере примерно 12 ч, примерно 24 ч или более, примерно 48 ч или более, примерно 3, 4, 5, 6, 7 или более дней и т.д., или любой другой соответствующий функционально значимый период (такой как время, достаточное для индукции, стимуляции, усиления и/или модуляции физиологического ответа, ассоциированного со связыванием антитела с антигеном, и/или время, достаточное для того, чтобы антитело могло проявлять эффекторную активность). Связывающая область (или связывающий домен, который можно применять согласно настоящему описанию, при этом они имеют одинаковое значение), которая взаимодействует с антигеном, содержит переменные области и тяжелой, и легкой цепей молекулы иммуноглобулина. Константные области антител (Ат) могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (такие как эффекторные клетки) и компоненты системы

комплемента, такие как C1q, первый компонент в классическом пути активации комплемента.

Как указано выше, в контексте настоящего описания понятие "антитело", если не указано иное или если это явно не противоречит контексту, включает

5 фрагменты антитела, которые сохраняют способность специфически взаимодействовать, например, связываться, с антигеном. Было установлено, что антигенсвязывающая функция антитела может осуществляться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, подпадающих под понятие "антитело", включают (I) Fab'- или Fab-фрагмент, одновалентный

10 фрагмент, состоящий из  $V_L$ -,  $V_H$ -,  $C_L$ - и  $C_H1$ -доменов, или одновалентное антитело, описанное в WO 2007/059782 (фирма Genmab A/S); (II) F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты, двухвалентные фрагменты, состоящие из двух Fab-фрагментов, сцепленных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (III) Fd-фрагмент, практически состоящий из  $V_H$ - и  $C_H1$ -доменов; (IV) Fv-фрагмент, практически состоящий из  $V_L$ - и  $V_H$ -доменов одного плеча антитела, (V) dAb-фрагмент (Ward и др., Nature 341, 1989, сс. 544-546), который практически состоит из  $V_H$ -домена и которые обозначают также как доменные антитела (Holt и др., Trends Biotechnol. 21(11), ноябрь 2003 г., сс. 484-490); (VI) верблюжьих антитела или нанотела (Revetz и др., Expert Opin Biol Ther. 5(1), январь 2005 г., сс. 111-124) и

20 (VII) выделенный определяющий комплементарность участок (CDR). Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента,  $V_L$  и  $V_H$ , кодируются различными генами, их можно соединять, используя методы рекомбинации, с помощью синтетического линкера, который позволяет им образовывать единую белковую цепь, в которой  $V_L$ - и  $V_H$ -области спариваются, образуя одновалентные

25 молекулы (известные как одноцепочечные антитела или одноцепочечный Fv (scFv) (см., например, Bird и др., Science 242, 1988, сс. 423-426 и Huston и др., PNAS USA 85, 1988, сс. 5879-5883). Указанные одноцепочечные антитела подпадают под понятие антитела, если не указано иное или если это явно не противоречит контексту. Хотя указанные фрагменты, как правило, подпадают

30 под понятие "антитело", они в совокупности и каждый независимо друг от друга являются уникальными объектами настоящего изобретения, обладающими различными биологическими свойствами и ценностью. Обсуждение этих и других ценных в контексте настоящего изобретения фрагментов антител

представлено ниже в настоящем описании. Должно быть очевидно, что понятие "антитело", если специально не указано иное, включает также поликлональные антитела, моноклональные антитела (МАт), подобные антителам полипептиды, такие как химерные антитела и гуманизированные антитела, и фрагменты антител, сохраняющие способность специфически связываться с антигеном (антигенсвязывающие фрагменты), полученные с помощью любой известной технологии, такой как ферментативное расщепление, пептидный синтез и методы рекомбинации. Полученное антитело может иметь любой изотип.

Когда антитело представляет собой фрагмент, такой как связывающий фрагмент, то из контекста настоящего изобретения должно быть очевидно, что указанный фрагмент слит с Fc-областью, указанной в настоящем описании. Таким образом, антитело может представлять собой слитый белок, который подпадает под объем изобретения. Так, в одном из вариантов осуществления изобретения белок представляет собой слитый белок.

В контексте настоящего описания понятие "гуманизированные" касательно антител относится к генетически сконструированному нечеловеческому антителу, которое содержит константные домены человеческого антитела и нечеловеческие переменные домены, модифицированные таким образом, что они обладают высоким уровнем гомологии последовательности с человеческими переменными доменами. Для достижения этого можно применять трансплантацию определяющих комплементарность участков (CDR) нечеловеческого антитела, которые вместе образуют антигенсвязывающий центр, на гомологичный человеческий акцепторный каркасный участок (FR) (см., например, WO 92/22653 и EP 0629240). Для полного восстановления аффинности и специфичности связывающей области родительского антитела может потребоваться замена каркасных участков из родительского антитела (т.е. нечеловеческого антитела) на человеческие каркасные участки (обратные мутации). Моделирование структурной гомологии может способствовать идентификации аминокислотных остатков в каркасных участках, которые являются важными для связывающих свойств связывающей области антитела. Таким образом, гуманизированная переменная область или антитело может содержать последовательности нечеловеческих CDR, преимущественно человеческие каркасные участки, необязательно содержащие одну или несколько

обратных мутаций аминокислот в нечеловеческой аминокислотной последовательности. Необязательно дополнительные аминокислотные модификации, которые необязательно представляют собой обратные мутации, можно применять для получения гуманизированного антитела или гуманизированной переменной области с предпочтительными характеристиками, такие как особенно ценная аффинность и биохимические свойства, например, для включения модификаций, которые предотвращают деаμιdирование, обеспечивают получение "инертной Fc-области", усиливают гетеродимеризацию и/или облегчают производство.

10 В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие "человеческие" в контексте переменных областей антител и антител включает антитела, которые можно генетически конструировать, имеющие переменные и каркасные участки, имеющие происхождение из последовательностей иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии, и константные домены, имеющие происхождение из константного домена человеческого иммуноглобулина. Человеческие переменные области или человеческие антитела, предлагаемые в изобретении, могут включать аминокислотные остатки, которые не кодируются последовательностями иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии (например, мутации, инсерции или делеции, индуцированные посредством неспецифического сайтнаправленного мутагенеза *in vitro* или с помощью соматической мутации *in vivo*). "Человеческое антитело" может включать последовательности VH и VL, которые были созданы из последовательностей иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии у человека, у трансгенного животного, например, согласно методу, описанному у Lee и др., Nature Biotech, 32(4), 2014, сс. 355-363 и Macdonald и др., PNAS 111 (14), 8 апреля 2014 г., сс. 5147-5152 или т.п. Указанные последовательности VH и VL рассматриваются как человеческие последовательности VH и VL, которые можно сливать с константными доменами, имеющими происхождение из константного домена человеческого иммуноглобулина. Необязательно можно применять дополнительные аминокислотные модификации, которые необязательно представляют собой обратные мутации, для получения человеческого антитела или человеческой переменной области с предпочтительными характеристиками, такими как особенно ценная аффинность

и биохимические свойства, например, для включения модификаций, которые предотвращают дезамидирование, обеспечивают получение "инертной Fc-области", усиливают гетеродимеризацию и/или облегчают производство. Таким образом, "человеческие антитела" могут представлять собой сконструированные антитела.

В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие "комплементзависимая цитотоксичность" ("CDC") относится к процессу опосредуемой антителом активации комплемента, приводящему к лизису клетки или вириона в результате образования пор в мембране, которые создаются при сборке MAC (мембраноатакующий комплекс), когда антитело связывается со своей мишенью на клетке или вирионе.

В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие "антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность" ("ADCC") относится к механизму цитолиза покрытых антителом клеток-мишеней или вирионов клетками, экспрессирующими Fc-рецепторы, которые распознают константную область связанного антитела.

В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие "иммуноглобулиновая тяжелая цепь" или "тяжелая цепь иммуноглобулина" относится к одной из тяжелых цепей иммуноглобулина. Тяжелая цепь, как правило, содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначенную в настоящем описании как VH) и константную область тяжелой цепи (сокращенно обозначенную в настоящем описании как CH), которая определяет изотип иммуноглобулина. Константная область тяжелой цепи, как правило, состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. CH1 и CH2, как правило, сцеплены через шарнирную область.

В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие "иммуноглобулин" относится к классу структурно родственных гликопротеинов, состоящих из двух пар полипептидных цепей, одной пары легких (L) низкомолекулярных цепей и одной пары тяжелых (H) цепей, все четыре цепи потенциально взаимосвязаны дисульфидными мостиками. Структура иммуноглобулинов хорошо охарактеризована (см., например, *Fundamental Immunology*, глава 7 (под ред. Paul W., 2-ое изд., изд-во Raven Press, N.Y., 1989)). В структуре иммуноглобулина две тяжелые цепи взаимосвязаны через

дисульфидные мостики в так называемой "шарнирной области". Аналогично тяжелым цепям, каждая легкая цепь, как правило, состоит из нескольких областей; переменной области легкой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем описании как VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи, как правило, состоит из одного домена, CL. Кроме того, VH- и VL-области могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности (или гипервариабельные участки которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или могут формировать петли определенной структуры), которые называют также определяющими комплементарность участками (CDR), которые чередуются с более консервативными участками, называемыми каркасными участками (FR). Каждая VH и VL, как правило, состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (см., также, например, Lefranc M.P. и др., Dev Comp Immunol Jan 27(1), 2003, сс. 55-77).

В контексте настоящего описания понятие "первый полипептид" и "второй полипептид" относится к набору полипептидов, которые могут быть идентичными или различными по аминокислотной последовательности. Так, первый и второй полипептиды могут образовывать гомодимер или гетеродимер. Первый и второй полипептиды могут связываться с дополнительными полипептидами.

В контексте настоящего описания понятие "изотип" относится к изотипу иммуноглобулина (например, IgG, IgD, IgA, IgE или IgM) или их подклассам (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) или любым их аллотипам, кодируемым генами константной области тяжелой цепи. Примеры аллотипов IgG1 включают IgG1m(za) и IgG1m(f). Таким образом, в одном из объектов изобретения белок содержит тяжелую цепь иммуноглобулина IgG1-класса или любого его аллотипа. Кроме того, каждый изотип тяжелой цепи может быть объединен с легкой каппа-(κ) и/или лямбда-(λ) цепью или любыми их аллотипами.

В контексте настоящего описания понятие "шарнирная область" относится к шарнирной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, шарнирная область человеческого антитела IgG1-изотипа соответствует аминокислотам 216-230 согласно E<sub>u</sub>-нумерации, предложенной Кэботом

(описана у Kabat E.A. и др., Sequences of proteins of immunological interest. 5-ое изд., изд-во US Department of Health and Human Services, NIH-публикация №. 91-3242, 1991, сс. 662, 680, 689).

5 VH- и VL-области могут представлять собой "человеческие VH- и VL-  
области" или "гуманизированные VH- и VL-области". Должно быть очевидно,  
что касательно человеческой VH- и/или человеческой VL-области такая область,  
как правило, состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца  
к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3,  
CDR3, FR4, которые имеют происхождение или присутствуют в  
10 последовательностях человеческой зародышевой линии. Указанные VH- и VL-  
области могут иметь происхождение из гуманизированных антител, полученных  
с использованием созданных на животных моделей, или из человеческих  
антител. Например, человеческие моноклональные антитела можно получать с  
помощью гибридомы, которая включает В-клетку, полученную из трансгенного  
15 или трансхромосомного животного кроме человека, такого как трансгенная  
мышь, которая имеет геном, содержащий трансген человеческой тяжелой цепи и  
трансген человеческой легкой цепи, слитый с иммортализованной клеткой.  
Человеческие моноклональные антитела могут иметь происхождение из  
человеческих В-клеток или плазматических клеток. В контексте настоящего  
20 описания понятие "гуманизированные VH- и VL-области" относится к  
генетически сконструированным VH- и VL-областям, имеющим происхождение  
из нечеловеческого антитела, модифицированного таким образом, чтобы  
обладать высоким уровнем гомологии последовательностей с человеческими  
вариабельными доменами. Для достижения этого можно применять  
25 трансплантацию определяющих комплементарность участков (CDR)  
нечеловеческого антитела, которые вместе образуют антигенсвязывающий  
центр, на гомологичный человеческий акцепторный каркасный участок (FR)  
(см., например, WO 92/22653 и EP 0629240). Для полного восстановления  
аффинности и специфичности связывающей области родительского антитела  
30 может потребоваться замена каркасных участков из родительского антитела (т.е.  
нечеловеческого антитела) на человеческие каркасные участки (обратные  
мутации). Моделирование структурной гомологии может способствовать  
идентификации аминокислотных остатков в каркасных участках, которые

являются важными для связывающих свойств антитела. Таким образом, гуманизированные VH- и VL-области могут содержать последовательности нечеловеческих CDR, преимущественно человеческие каркасные участки, необязательно содержащие одну или несколько обратных мутаций аминокислот в нечеловеческой аминокислотной последовательности. Необязательно дополнительные аминокислотные модификации, которые необязательно представляют собой обратные мутации, можно применять для получения гуманизированного антитела или гуманизированной вариабельной области или человеческих VH- или VL-областей с предпочтительными характеристиками, такими как особенно ценная аффинность и биохимические свойства, например, включать модификации, которые предотвращают дезамидирование, обеспечивают получение "инертной Fc-области", усиливают гетеродимеризацию и/или облегчают производство.

В контексте настоящего описания понятие "CH2-участок" или "CH2-домен" относится к CH2-участку тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, CH2-участку человеческого антитела IgG1-изотипа соответствуют аминокислоты 231-340 согласно системе Eu-нумерации. Однако CH2-участок может представлять собой также участок других подтипов, указанных в настоящем описании.

В контексте настоящего описания понятие "CH3-участок" или "CH3-домен" относится к CH3-участку тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, CH3-участку человеческого антитела IgG1-изотипа соответствуют аминокислоты 341-447 согласно системе Eu-нумерации. Однако CH3-участок может представлять собой также участок других подтипов, указанных в настоящем описании.

В контексте настоящего описания понятие "полноразмерное антитело" относится к антителу (например, родительскому антителу или его варианту), которое содержит все константные и вариабельные домены тяжелых и легких цепей, соответствующие доменам, которые в норме присутствуют в антителе дикого типа, т.е. которое имеет соответственно VH-, CH1-, линкер, CH2-, CH3-области в тяжелой цепи и имеет соответственно VL- и CL-области в легкой цепи, такие, например, как человеческой (или гуманизированной) тяжелой цепи IgG1 или т.п. или человеческой (или гуманизированной) легкой каппа- или лямбда цепи. Должно быть очевидно, что биспецифическое антитело может представлять собой также полноразмерное антитело, т.е. содержать различные

тяжелые и/или легкие цепи, которые в норме присутствуют в антителе дикого типа или т.п. Полноразмерные антитела можно конструировать так, чтобы они содержали, например, указанные в описании замены или модификации, предлагаемые в изобретении.

5 В контексте настоящего описания понятие "аминокислота, соответствующая положениям" относится к номеру аминокислотного положения в тяжелой цепи человеческого IgG1. Если не указано иное или если это явно не противоречит контексту, аминокислоты в последовательностях константных областей в настоящем описании нумеруют согласно Eu-индексу (описан у Kabat  
10 E.A. и др., Sequences of proteins of immunological interest. 5-ое изд., изд-во US Department of Health and Human Services, NIH-публикация № 91-3242, 1991, сс. 662, 680, 689). Так, аминокислота или сегмент в одной последовательности, которая/который "соответствует" аминокислоте или сегменту в другой последовательности, представляет собой аминокислоту или сегмент,  
15 выровненную/выровненный с другой аминокислотой или сегментом с использованием стандартной программы сравнительного анализа последовательностей, такой как ALIGN, ClustalW или подобной программы, как правило, с задаваемыми по умолчанию параметрами, и обладает идентичностью, составляющей по меньшей мере 50%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере  
20 90% или по меньшей мере 95% , с тяжелой цепью человеческого IgG1. В данной области хорошо известно, как выравнивать последовательность или сегмент в последовательности и, таким образом, определять положение в последовательности, соответствующее аминокислотному положению, предлагаемому в настоящем изобретении.

25 В контексте настоящего изобретения аминокислота может относиться к консервативному или неконсервативному классу. Таким, классы аминокислот могут быть отражены в одной или нескольких следующих таблицах:

Аминокислотные остатки консервативного класса

Кислые остатки	D и E
Основные остатки	K, R и H
Гидрофильные незаряженные остатки	S, T, N и Q
Алифатические незаряженные остатки	G, A, V, L и I
Неполярные незаряженные остатки	C, M и P
Ароматические остатки	F, Y и W

Альтернативные классификации аминокислотных остатков по физическим свойствам и функции

Содержащие спиртовую группу остатки	S и T
Алифатические остатки	I, L, V и M
Связанные с циклоалкенилом остатки	F, H, W и Y
Гидрофобные остатки	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W и Y
Отрицательно заряженные остатки	D и E
Полярные остатки	C, D, E, H, K, N, Q, R, S и T
Положительно заряженные остатки	H, K и R
Малые остатки	A, C, D, G, N, P, S, T и V
Очень малые остатки	A, G и S
Остатки, участвующие в образовании складки	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P и T
Гибкие остатки	Q, T, K, S, G, P, D, E и R

5 В контексте настоящего изобретения замену в белке обозначают как:  
исходная аминокислота – положение – применяемая для замены  
аминокислота.

В соответствии с общепризнанной номенклатурой аминокислот используют  
10 трехбуквенный код или однобуквенный код, включая коды Хаа и X для  
обозначения любого аминокислотного остатка. Таким образом, обозначение  
"L234F" или "Leu234Phe" означает, что белок содержит замену лейцина  
фенилаланином в аминокислотном положении белка, соответствующем  
аминокислоте в положении 234 в белке дикого типа.

15 Замену аминокислоты в данном положении любой другой аминокислотой  
обозначают как:

исходная аминокислота– положение; или, например, "L234".

20 Для модификации, в которой исходная(ые) аминокислота(ы) и/или  
применяемая(ые) для замены аминокислота(ы) могут содержать более одной  
аминокислоты, но не все аминокислоты, более чем одну аминокислоту можно  
разделять с помощью "," или "/". Например, замену лейцина на фенилаланин,  
аргинин или триптофан в положении 234 обозначают как:

"Leu234Phe,Arg,Lys,Trp" или "L234F,R,K,W", или "L234F/R/K/W", или  
"L234 на F, R, K или W".

25 Такое обозначение можно использовать взаимозаменяемо в контексте  
изобретения, но оно имеет одинаковое значение и цель.

Кроме того, понятие "замена" или "мутация", которые можно использовать взаимозаменяемо, включают замену на любую одну или 19 встречающихся в естественных условиях аминокислот или на другие аминокислоты, такие как не встречающиеся в естественных условиях аминокислоты. Например, замена

5 аминокислоты L в положении 234 включает каждую из следующих замен: 234A, 234C, 234D, 234E, 234F, 234G, 234H, 234I, 234K, 234M, 234N, 234Q, 234R, 234S, 234T, 234V, 234W, 234P и 234Y. Причем, это эквивалентно обозначению 234X, где X обозначает любую аминокислоту, отличную от исходной аминокислоты.

Указанные замены можно обозначать также как L234A, L234C и т.д. или

10 L234A,C и т.д., или L234A/C/и т.д. то же самое применимо по аналогии к каждому и всем положениям, указанным в настоящем описании, для специального включения в настоящее описание любой из таких замен. В данной области хорошо известно, что, когда аминокислотная последовательность содержит "X" или "Хаа", то указанный X или Хаа обозначает любую

15 аминокислоту. Так, X или Хаа могут, как правило, обозначать любую из 20 встречающихся в естественных условиях аминокислот. В контексте настоящего описания понятие "встречающийся в естественных условиях" относится к любому из следующих аминокислотных остатков: глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин, лизин, аргинин, гистидин, аспарагиновая

20 кислота, аспарагин, глутаминовая кислота, глутамин, пролин, триптофан, фенилланин, тирозин, метионин и цистеин. Понятия "аминокислота" и "аминокислотный остаток" можно использовать взаимозаменяемо. Для целей настоящего изобретения идентичность последовательности между двумя аминокислотными последовательностями можно определять, используя

25 алгоритм Нидлмана-Вунша (Needleman и Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 1970, сс. 443-453), реализованного в программе Needle пакета программ EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (Европейский открытый программный комплекс для молекулярной биологии), Rice и др., Trends Genet. 16, 2000, сс. 276-277), предпочтительно версия 5.0.0 или более поздняя.

30 Применяемые параметры включают штраф за открытие бреши, равный 10, штраф за расширение бреши, равный 0,5, и матрица замен EBLOSUM62 (версия BLOSUM62 для EMBOSS). Выходные данные Needle с надписью "самая длинная

идентичность" (полученные с использованием опции -nobrief) используют в качестве процента идентичности и рассчитывают следующим образом:

(идентичные остатки  $\times$  100)/(длина выравнивания - общее количество брешей при выравнивании).

5 Сохранение аналогичных остатков также или в альтернативном варианте можно измерять с помощью показателя подобия, определенного с использованием программы BLAST (например, BLAST 2.2.8, доступной через NCBI, используя стандартные установки BLOSUM62, открытая брешь=11 и расширенная брешь=1).

10 В одном из вариантов осуществления изобретения по меньшей мере в одном из указанных первого и второго полипептидов аминокислота в положениях, соответствующих положениям L234, L235 и G236 в тяжелой цепи человеческого IgG1, не представляет собой L, L и G соответственно. Предложен белок, который содержит первый полипептид и второй полипептид, в котором  
15 указанный первый и второй полипептид каждый содержит по меньшей мере шарнирную область, СН<sub>2</sub>-участок и СН<sub>3</sub>-участок соответственно тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина IgG1, в котором по меньшей мере один из указанных первого и второго полипептидов является модифицированным и содержит замену аминокислот, соответствующих аминокислотам в положениях  
20 L234, L235 и G236, где положения аминокислот определены согласно EU-нумерации. Предпочтительно аминокислоты в указанных положениях L234, L235 и G236 по меньшей мере в одном из указанных первого и второго полипептида заменены на F, E и R соответственно.

25 Касательно аминокислотных положений, то в контексте настоящего описания они пронумерованы согласно Eu-нумерации, то есть в соответствии с Eu-индексом нумерации, который описан у Kabat E.A. и др., Sequences of proteins of immunological interest. 5-ое изд., изд-во US Department of Health and Human Services, NIH-публикация №. 91-3242, 1991, сс. 662, 680, 689.

30 Последовательности представляющих интерес аминокислотных последовательностей, предлагаемых в изобретении, также представлены в настоящем описании с указанными аминокислотными модификациями, выделенными жирным шрифтом (см. таблицу 1).

Как продемонстрировано, например, в разделе "Примеры", примером белка, предлагаемого в изобретении, может быть антитело, состоящее из двух идентичных тяжелых цепей (которые соответствуют первому и второму полипептидам) и двух идентичных легких цепей. Однако не требуется, чтобы и первый, и второй полипептиды имели одинаковые замены, например, один из первого и второго полипептидов может иметь указанные замены в положениях L234, L235 и G236, а другой может иметь, например, другие замены. Таким образом, другая цепь может иметь, например, замены другого инертного формата, например, FEA-формата. В контексте настоящего изобретения дополнительным преимуществом неактивирующих замен в положениях L234, L235 и G236 считается то, что они эффективно подавляют опосредуемую Fc эффекторную функцию, даже если являются "асимметричными", т.е. когда другой полипептид имеет другой инертный формат, такой как FEA-формат. Это делает возможным получение мультиспецифических антител путем объединения вновь созданного антитела с инертным FER-форматом с ранее полученными антителами, имеющими другие неактивирующие замены, такие как FEA-формат.

Таким образом, в следующем варианте осуществления изобретения предложен белок, предлагаемый в изобретении, в котором один из первого и второго полипептидов содержит указанную замену аминокислот, соответствующих аминокислотам в положениях L234, L235 и G236, а другой является модифицированным и содержит замену аминокислот, соответствующих аминокислотам в положениях L234, L235 и D265, где предпочтительно указанные замены представляют собой F, E и A соответственно.

В другом варианте осуществления в белке, предлагаемом в изобретении, указанные первый и второй полипептиды оба содержат указанные замены аминокислот, соответствующих аминокислотам L234, L235 и G236, которые предпочтительно заменяют на F, E и R соответственно.

В другом варианте осуществления изобретения каждый из указанных первого и второго полипептидов содержит СН1-участок иммуноглобулина. Указанный СН1-участок предпочтительно сцеплен с шарнирной областью, т.е. предложены указанные полипептиды с СН1-участком, шарнирной областью, СН2-участком и СН3-участком соответственно тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина IgG1. Предпочтительно СН1-участок представляет собой

участок тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина IgG1. Например, CH1-  
участок может представлять собой последовательность, которая имеет  
последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4. CH1-участок, шарнирная  
область, CH2-участок и CH3-участок, указанные в настоящем описании, могут  
5 иметь последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5. Рассматриваемая  
последовательность может иметь замены, указанные в настоящем описании,  
например, FER-замены и/или другие замены, указанные в настоящем описании.

В другом варианте осуществления изобретения белок, предлагаемый в  
изобретении, содержит первую и вторую связывающую область. Может быть  
10 достаточно любого связывающего участка, однако может быть  
предпочтительным, чтобы связывающие участки имели происхождение из  
связывающих областей иммуноглобулина, такого как человеческие или  
гуманизированные антитела.

В контексте настоящего описания понятие "связывающая область" или  
15 "связывающий домен" относится к области белка, которая обладает  
способностью связываться с антигеном, таким как полипептид, например,  
присутствующий на клетке, например, на раковой клетке, бактерии или вирусе.  
Связывающая область может представлять собой полипептидную  
последовательность, такую как белок, белковый лиганд, рецептор,  
20 антигенсвязывающая область или лигандсвязывающая область, которая обладает  
способностью связываться с клеткой, бактерией или вирионом. В частности,  
связывающая область представляет собой антигенсвязывающую область. Если  
связывающая область представляет собой, например, рецептор, то белок можно  
получать в виде связанного белка Fc-домена иммуноглобулина и указанного  
25 рецептора. Если связывающая область представляет собой антигенсвязывающую  
область, то белок, предлагаемый в изобретении, может представлять собой  
антитело, химерное антитело или антитело, имеющее гуманизированную или  
человеческую связывающую область антитела или только тяжелую цепь  
антитела или слияние ScFv-Fc.

30 В контексте настоящего описания понятие "связывание" относится к  
связыванию антитела с предварительно заданным/заданной антигеном или  
мишенью, как правило, с аффинностью связывания, соответствующей  $K_D$   $1E^{-6}M$   
или менее, например,  $5E^{-7}M$  или менее,  $1E^{-7}M$  или менее, например,  $5E^{-8}M$  или

менее, например,  $1E^{-8}M$  или менее, например,  $5E^{-9}M$  или менее, или, например,  $1E^{-9}M$  или менее, при определении с помощью биослойной интерферометрии с использованием антитела в качестве лиганда и антигена в качестве аналита, и антитело связывается с предварительно заданным антигеном с аффинностью, соответствующей KD, которая по меньшей мере в десять раз ниже, например, по меньшей мере в 100 раз ниже, например, по меньшей мере в 1000 раз ниже, например, по меньшей мере в 100000 раз ниже, например, по меньшей мере в 100000 раз ниже, чем его аффинность связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином), отличным от заданного антигена или близкородственного антигена.

Таким образом, в следующем объекте изобретения белок, предлагаемый в изобретении, содержит указанные первую и вторую связывающие области, которые содержат соответственно первую переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина (VH) и первую переменную область легкой цепи иммуноглобулина (VL), и в котором указанная вторая связывающая область содержит вторую переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина и вторую переменную область легкой цепи иммуноглобулина. Должно быть очевидно, что эти области предпочтительно представляют собой человеческие или гуманизированные VH- и VL-области. Так, VH- и VL-области имеют каркасные участки, которые являются человеческими или имеют происхождение из человеческого антитела, и могут иметь последовательности CDR1-3, которые являются человеческими или имеют происхождение из человеческого антитела или антитела другого вида, такого как мыши или крысы. Таким образом, еще в одном варианте осуществления изобретения указанные переменные области тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина представляют собой человеческие или гуманизированные переменные области тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина.

Как указано выше, белки, предлагаемые в изобретении, включают антитела. Так, в другом варианте осуществления изобретения указанные первый и второй полипептиды представляют собой тяжелые цепи иммуноглобулина, при этом указанные первый и второй полипептиды содержат указанные соответствующие первую и вторую переменные области тяжелой цепи иммуноглобулина. Должно быть очевидно, что указанные тяжелые цепи предпочтительно могут

представлять собой человеческие тяжелые цепи или гуманизированные тяжелые цепи, когда они содержат человеческие переменные области, то должно быть очевидно, что они могут содержать человеческие или гуманизированные переменные области и человеческие константные области. Кроме того, 5 указанный белок может содержать первую константную область легкой цепи иммуноглобулина и вторую константную область легкой цепи иммуноглобулина, более предпочтительно, когда указанный белок содержит первую и вторую легкие цепи иммуноглобулина, то указанные легкой цепи иммуноглобулина содержат указанные соответствующие первую и вторую 10 переменные области легких цепей иммуноглобулина и указанные соответствующие первую и вторую константные области легких цепей иммуноглобулина. Должно быть очевидно, что особенно предпочтительно указанные легкие цепи должны представлять собой человеческие легкие цепи или гуманизированные легкие цепи, когда они содержат нечеловеческие CDR- 15 участки. Легкие цепи могут иметь переменную область легкой цепи и константную область человеческой легкой каппа-цепи или константную область человеческой легкой лямбда-цепи. В следующем варианте осуществления изобретения константная область человеческой легкой каппа-цепи указана в SEQ ID NO: 6. В другом варианте осуществления изобретения константная 20 область человеческой легкой лямбда-цепи указана в SEQ ID NO: 7. Указанные легкие цепи могут содержать легкие каппа- или лямбда-цепи, или их обеих, например, белок может содержать одну легкую каппа-цепь и одну легкую лямбда-цепь, поскольку белок, предлагаемый в изобретении, может содержать две различные легкие цепи. Таким образом, указанные легкие цепи могут 25 представлять либо человеческие, либо гуманизированные легкие каппа- или лямбда-цепи, или оба вида цепей, например, белок может содержать одну человеческую легкую каппа-цепь и одну человеческую легкую лямбда-цепь, поскольку белок, предлагаемый в изобретении, может содержать две различные легкие цепи.

30 Должно быть очевидно, что человеческие или гуманизированные тяжелые и легкие цепи могут содержать в дополнение к мутациям, указанным в настоящем описании, дополнительные модификации, обеспечивающие предпочтительные характеристики, такие как особенно ценная аффинность и биохимические

свойства, включая модификации, которые предотвращают дезамидирование и/или усиливают гетеродимеризацию, и/или облегчают производство и разделение или т.п.

5 Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления изобретения белок, предлагаемый в изобретении, который содержит указанные первый и второй полипептиды, состоит из или содержит первую и вторую легкие цепи иммуноглобулина и первую и вторую тяжелые цепи иммуноглобулина, последние соответствуют первому и второму полипептидам. Указанный белок, предлагаемый в изобретении, может иметь первую легкую цепь  
10 иммуноглобулина, связанную с указанной первой тяжелой цепью иммуноглобулина через дисульфидные мостики, и указанную вторую легкую цепь иммуноглобулина, связанную с указанной второй тяжелой цепью иммуноглобулина через дисульфидные мостики, с образованием указанной первой связывающей области и указанной второй связывающей области  
15 соответственно, и в котором указанные первая и вторая тяжелые цепи иммуноглобулина связаны также через дисульфидные мостики. В контексте настоящего описания понятие "дисульфидные мостики" относится к ковалентной связи между двумя остатками цистеина, т.е. указанное взаимодействие можно обозначать также как Cys-Cys-взаимодействие.

20 В следующем варианте осуществления изобретения, который может представлять собой предпочтительный вариант осуществления изобретения, белок, предлагаемый в изобретении, представляет собой антитело, которое предпочтительно представляет собой полноразмерное антитело. В следующем варианте осуществления изобретения полноразмерное антитело представляет  
25 собой антитело человеческого IgG1-изотипа или получено из него.

Должно быть очевидно, что согласно изобретению замены в указанных положениях должны приводить к пониженным опосредуемым Fc эффекторным функциям, например, при включении их в антитело. Указанные пониженные опосредуемые Fc эффекторные функции включают пониженную CDC-  
30 активность (см. в том числе примеры 3 и 5), пониженное C1q-связывание (см. в том числе пример 4), пониженную ADCC (см. в том числе пример 9), не поддающееся обнаружению связывание с человеческими FcγRIa, FcγRIIa(H), FcγRIIa(R), FcγRIIb, FcγRIIIa(F) и FcγRIIIa(V) (см. в том числе пример 6) и

отсутствие поддающих обнаружению активации и передачи сигналов через человеческие FcγRIa, FcγRIIa(H), FcγRIIa(R), FcγRIIb, FcγRIIIa(F) и FcγRIIIa(V) (пример 7), и отсутствие способности индуцировать ассоциированную с опухолью антигеннезависимую активацию Т-клеток в контексте таргетинга CD3 (см. в том числе пример 10), а также наличие требуемой фармакокинетики, в том числе из-за способности связываться с человеческим FcRn, сходной со способностью человеческого IgG1 дикого типа, и гликозилирования, весьма сходного с гликозилированием человеческих антител дикого типа IgG1-изотипа, или т.п., когда указанные замены включены в контекст антитела (см., например, примеры 12 и 14). Кроме того, указанные замены могут обеспечивать повышенную рН-стабильность при низких значениях рН (см. в том числе примеры 20-23). Не только белки, предлагаемые в изобретении, являются ценными в контексте антител, которые могут представлять собой весьма предпочтительные варианты осуществления изобретения, но к ним относятся и белки других форматов, такие как слитые белки, которые имеют указанный первый и второй полипептиды, предлагаемые в изобретении, содержащие по меньшей мере шарнирную область, СН2-участок и СН3-участок, в которых по меньшей мере один из указанных первого и второго полипептидов является модифицированным и содержит замену аминокислот, соответствующих аминокислотам в положениях L234, L235 и G236, где положения аминокислот определены согласно EU-нумерации.

В контексте настоящего описания понятия "пониженные" или "не поддающиеся обнаружению" касательно опосредуемых Fc эффекторных функций относятся к способности белка, предлагаемого в изобретении, такого как антитело, индуцировать CDC-активность, ADCC, C1q-связывание, связывание FcγRIa, FcγRIIa(H), FcγRIIa(R), FcγRIIb, FcγRIIIa(F) и FcγRIIIa(V), активацию и передачу сигналов через FcγRIa, FcγRIIa(H), FcγRIIa(R), FcγRIIb, FcγRIIIa(F) и FcγRIIIa(V) и активацию Т-клеток в контексте таргетинга CD3 по сравнению с таким же белком, имеющим Fc-область IgG1 дикого типа или т.п., который в полном объеме обладает способностью индуцировать указанные эффекторные функции, например, в контексте антител или подобных белков, например, описанных в разделе "Примеры". Примеры анализов, применяемых для оценки "пониженного" или "не поддающегося обнаружению" связывания

указанных свойств известны в данной области и подробно описаны, например, повсеместно в разделе "Примеры". В разделе "Примеры" описаны особенности

указанных свойств в контексте антител, таких как полноразмерные антитела. Должно быть очевидно, что весьма предпочтительные особенности определяют в контексте, подобном описанному в разделе "Примеры", что не означает, что белки, предлагаемые в изобретении, ограничены антителами, поскольку обладающие преимуществом особенности модифицированной шарнирной области, СН2-участка и СН3-участка соответственно тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина IgG1, предлагаемого в изобретении, могут быть ценными также в других форматах, таких как слитые белки или т.п. Тем не менее, как продемонстрировано в настоящем описании, это предпочтительно применять в контексте антител.

Способность белка индуцировать комплементзависимую цитотоксичность (CDC) можно определять методами, известными в данной области. В целом, метод состоит в следующем: белок-стандарт, имеющий немодифицированную полностью функциональную Fc-область, например, антитело IgG1-изотипа, который является сильным индуктором CDC, при осуществлении анализа *in vitro* инкубируют с клетками, презентующими антиген на их клеточной поверхности, в присутствии человеческой сыворотки, а затем определяют процент лизиса клеток, который принимают за 100%. Процент лизиса клеток в присутствии белка, предлагаемого в изобретении, имеющего модифицированную Fc-область, например, антитела с FER-Fc-областью, сравнивают с лизисом клеток при применении контрольного белка, который не таргетирует клетку или не имеет Fc-области (такого, например, как F(ab')<sub>2</sub>), в таких же условиях. Процент лизиса определяют, сравнивая немодифицированный стандарт, принятый за 100%. Пример приемлемого метода, который можно применять, является метод, описанный в примере 3 или примере 5. Белок, предлагаемый в изобретении, обладает пониженной CDC-активностью при сравнении с таким же белком, который вместо этого имеет Fc-область FEA-формата, и/или обладает сходной CDC-активностью по сравнению, например, с F(ab')<sub>2</sub>.

Способность белка обладать пониженным C1q-связыванием можно определять с помощью методов, известных в данной области. В целом, метод

состоит в следующем: белок, имеющий (немодифицированную) полностью функциональную Fc-область, например, антитело, при осуществлении анализа *in vitro* инкубируют с клетками, презентующими антиген-мишень на их клеточной поверхности, в присутствии человеческой сыворотки, а затем определяют процент C1q-связывания например, оценивая связывание, например, с поликлональным кроличьим антителом к человеческому компоненту C1q, меченного с помощью FITC (Dako, каталожный № F0254, фирма Agilent Technologies) и с использованием FACS-анализа согласно инструкциям производителя. Обнаруженный сигнал белка, имеющего (немодифицированную) полностью функциональную Fc-область, сравнивают с сигналом белка, имеющего модифицированную Fc-область, например, антитела IgG1-изотипа, которое является сильным индуктором CDC. Подробное описание приведенного в качестве примера приемлемого предлагаемого в изобретении метода, который можно применять, представлено в примере 4. Белок, предлагаемый в изобретении, обладает пониженной CDC-активностью по сравнению с таким же белком, который вместо этого имеет Fc-область FEA-формата, и/или обладает сходной CDC-активностью по сравнению, например, с несвязывающимся контрольным антителом. Белок, предлагаемый в изобретении, предпочтительно обладает C1q-связывающей активностью, составляющей 15% или менее при сравнении полноразмерного антитела IgG1-изотипа с FER и антитела, имеющего такую же последовательность, но без FER, как описано в примере 4.

Способность снижать антигензависимую клеточную цитотоксичность можно определять с помощью методов, известных в данной области. Например, для определения ADCC-способности антител дикого типа и их неактивирующих вариантов можно применять набор для определения цитотоксичности DELFIA® (флуоресцентный иммуноанализ с усилением диссоциации лантаноидов) EuTDA TRF (флуоресценция с временным разрешением (каталожный № AD0116, фирма Perkin Elmer) согласно инструкциям производителя. В целом, метод состоит в следующем: клетки, презентующие антиген-мишень, метили с помощью внутриклеточной метки, например, используя раствор реагента бис(ацетоксиметил)-2,2':6',2''-терпиридин-6,6''-дикарбоксилата (реагент DELFIA BATDA, каталожный № C136-100, фирма Perkin Elmer), согласно инструкциям производителя. Эти клетки затем инкубировали с белком, имеющим

(немодифицированную) полностью функциональную Fc-область, например, антителом дикого типа против антигена-мишени и его неактивирующими вариантами, с РВМС-клетками, презентующими антиген-мишень на их клеточной поверхности, в присутствии РВМС. Оценку NK-опосредуемой ADCC 5 осуществляли в сравнении с полностью функциональным контрольным антителом IgG1-изотипа (результаты принимали за 100%) и несвязывающимся применяемым в качестве отрицательного контроля антителом IgG1-изотипа (результаты принимали за 0%). Подробное описание приведенного в качестве примера приемлемого предлагаемого в изобретении метода, который можно 10 применять, представлено в примере 9. Белок, предлагаемый в изобретении, предпочтительно обладает остаточной ADCC-активностью, составляющей 35% или менее, при сравнении, например, с полноразмерным антителом IgG1-изотипа с FER, с антителом, имеющим такую же последовательность, но без FER, как описано в примере 9. Белок, предлагаемый в изобретении, обладает 15 такой же пониженной ADCC-активностью по сравнению с таким же белком, который вместо этого имеет Fc-область с FEA-форматом.

Связывание с человеческими FcγRIa, FcγRIIa(H), FcγRIIa(R), FcγRIIb, FcγRIIIa(F) и FcγRIIIa(V) можно определять с помощью ELISA. Связывание белка, предлагаемого в изобретении, можно оценивать, определяя связывание с 20 меченым His биотинилированным на C-конце FcγR, мономерным ECD FcγRIa (SEQ ID NO: 15) (мономер) или димерным ECD FcγRIIa аллотипа 131H (SEQ ID NO: 16), FcγRIIa аллотипа 131R (SEQ ID NO: 17), FcγRIIb (SEQ ID NO: 18), FcγRIIIa аллотипа 158F (SEQ ID NO: 19) и FcγRIIIa аллотипа 158V (SEQ ID NO: 20), с помощью анализов ELISA. В целом 25 и в качестве примера метод состоял в следующем: антитело IgG1-изотипа с Fc-областью связывают с планшетом, покрытым антителом к человеческому F(ab')<sub>2</sub>, и затем инкубируют с каждым из соответствующих внеклеточных доменов, связывание которых затем количественно оценивают, используя стрептавидин-полиHRP (фирма CLB, каталожный № M2032, 1:10000).

30 Подробное описание приведенного в качестве примера приемлемого предлагаемого в изобретении метода, который можно применять, представлено в примере 6. Белок, предлагаемый в изобретении, например, антитело, не обладает поддающимся обнаружению связыванием с указанными Fcγ-рецепторами при

оценке с помощью анализа ELISA, в котором используют указанные меченные His биотинилированные на С-конце мономерные ECD FcγR. Белок, предлагаемый в изобретении, обладает сходным не поддающимся обнаружению связыванием с указанными Fcγ-рецепторами, обнаруженным при сравнении антитела IgG1-изотипа с Fc-областью, содержащей FER, например, с антителом с Fc-областью, содержащей FEA, что продемонстрировано, например, в примере 6.

Активацию и передачу сигналов через FcγRIa, FcγRIIa(H), FcγRIIa(R), FcγRIIb, FcγRIIIa(F) и FcγRIIIa(V) можно определять с использованием поступающих в продажу репортерных анализов. Например, репортерные анализы можно применять для определения активации и связывания белка, предлагаемого в изобретении, используя экспрессирующие мишень клетки и репортерную клеточную линию Jurkat, которая экспрессирует указанные FcγR (все фирмы Promega, FcγRIa: каталожный № CS1781C08; FcγRIIa аллотипа 131H: каталожный № G9991; FcγRIIa аллотипа 131R: каталожный № CS1781B08; FcγRIIb: каталожный № CS1781E04; FcγRIIIa аллотипа 158F: каталожный № G9790; FcγRIIIa аллотипа 158V: каталожный № G7010). Например, для таргетирующих CD20 антител в качестве клеток-мишеней можно применять экспрессирующие CD20 клетки Raji. Белок, предлагаемый в изобретении, такой как антитело, обладает сходными не поддающимися обнаружению активацией и передачей сигналов через указанные Fcγ-рецепторы по данным, полученным при сравнении, например, антитела с Fc-областью, содержащей FER, и антитела с Fc-областью, содержащей FEA, что продемонстрировано, например, в примере 7.

Касательно снижения активации Т-клеток в контексте таргетинга CD3, должно быть очевидно, что это относится к белку, предлагаемому в изобретении, который содержит связывающую область, которая связывает человеческим CD3 на человеческих Т-клетках, например, типичному двухвалентному моноспецифическому антителу, которое связывается с человеческим CD3, которое описано в примерах в настоящем описании. Снижение активации Т-клеток можно определять путем инкубации серий, предназначенных для оценки зависимости ответа от дозы, например, антитела к CD3, содержащего шарнирную область, CH2-участок и CH3-участок соответственно тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина IgG1 с заменами

аминокислот, соответствующих аминокислотам в положениях L234, L235 и G236 согласно EU-нумерации, в каждом из двух полипептидов, предлагаемых в изобретении, со свежевыделенными РВМС и последующего окрашивания указанных клеток мышинным антителом к человеческому CD28,

5 конъюгированным с PE (каталожный № 130-092-921; фирма Miltenyi Biotec; T-клеточный маркер) и мышинным антителом к человеческому CD69, конъюгированным с APC (каталожный № 340560; фирма BD Biosciences). Тем самым определяют повышающую регуляцию CD69 на T-клетках, что является показателем активации T-клеток. Подробное описание указанного анализа

10 представлено в примере 10. Белок, например, предлагаемое в изобретении антитело, таргетирующее человеческий CD3, может предупреждать или значительно снижать повышающую регуляцию CD69 по сравнению с антителом IgG1-изотипа, таргетирующим человеческий CD3, которое имеет Fc-область, напоминающую Fc-область дикого типа.

15 Белки, предлагаемые в изобретении, т.е. содержащие шарнир, CH2- и CH3-участок тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина IgG1, имеющие по меньшей мере замену аминокислот, соответствующих аминокислотам в положениях L234, L235 и G236, предпочтительно на F, E и R соответственно, предпочтительно должны иметь гликозилирование весьма сходное с

20 гликозилированием последовательности IgG1 дикого типа. Более конкретно, галактозилирование и/или присутствие заряженных гликанов в белке, предлагаемом в изобретении, предпочтительно находятся в том же диапазоне, что и в аминокислотной последовательности IgG1 дикого типа, полученной с использованием той же клеточной линии и тех же условий получения.

25 Пригодные для производства клетки-хозяева млекопитающих, включающие линии CHO-клеток, хорошо известны в данной области (см. в том числе Butler и Spearman, Curr Opin Biotechnol, 30, декабрь 2014 г., сс. 107-112). Общий процент галактозилирования предпочтительно находится в диапазоне плюс или минус 20% по сравнению с общим процентом галактозилирования, обнаруженным в

30 таком же белке, содержащем последовательность IgG1 дикого типа, такую как SEQ ID NO: 1 или т.п. Например, если последовательность IgG1 дикого типа или подобная последовательность имеет процент галактозилирования 25%, то общий процент может находиться в диапазоне от 5% до 45%. Общий процент

5 галактозилирования предпочтительно находится в диапазоне плюс или минус 20% по сравнению с общим процентом галактозилирования, обнаруженным в белке, предлагаемом в изобретении, который не содержит FER-формат. Общий процент заряженных гликанов предпочтительно находится в диапазоне плюс или  
10 минус 3% по сравнению с общим процентом заряженных гликанов, обнаруженным в такой же белке, содержащем последовательность IgG1 дикого типа, такую как SEQ ID NO: 1 или т.п. Например, если последовательность IgG1 дикого типа или подобная последовательность имеет процент заряженных гликанов 1%, то общий процент заряженных гликанов может находиться в  
15 диапазоне 0% - 4%. Общий процент заряженных гликанов предпочтительно находится в диапазоне плюс или минус 3% по сравнению с общим процентом заряженных гликанов, обнаруженным в белке, предлагаемом в изобретении, который не содержит FER-формат. Общий процент заряженных гликанов и/или процент галактозилирования белка, предлагаемого в изобретении, такого как  
20 антитело, предпочтительно находится в диапазоне плюс или минус 3% от общего процента заряженных гликанов и плюс или минус 20% по сравнению с общим процентом галактозилирования, обнаруженным в такой же белке, содержащем последовательность IgG1 дикого типа, такую как SEQ ID NO: 1 или т.п. Общий процент заряженных гликанов и/или процент галактозилирования  
25 белка, предлагаемого в изобретении, такого как антитело, предпочтительно находится в диапазоне плюс или минус 3% от общего процента заряженных гликанов и плюс или минус 20% по сравнению с общим процентом галактозилирования, обнаруженным в белке, предлагаемом в изобретении, который не содержит FER-формат.

25 Процент галактозилирования и/или заряженных гликанов в белке, предлагаемом в изобретении, таком как антитело, можно определять с использованием методов, известных в данной области. Такие методы описаны, например, в примере 14. Приемлемые методы включают мечение 2-аминобензамидом и последующий ЖХВР-анализ, например, описанный в  
30 примере 14, или ЖХ-МС с использованием масс-спектрометра Orbitrap Q-Extractive Plus. В настоящем описании процент галактозилирования и заряженных гликанов соответственно рассчитывают в виде процентного содержания галактозы или заряженных гликанов в олигосахаридах по

отношению ко всем гликанам, имеющим структуру А2F-гликанов. Количества, указанные в настоящем описании в виде процентов, представляют собой молярные количества, т.е. отражают количество молекул, а не массу. Проценты заряженных гликанов и/или галактозилирования можно определять в белке, предлагаемом в изобретении, таком как антитело, при их получении в клетках Ехр1293F. Например, как продемонстрировано в разделе "Примеры", в белке, полученном в клетках Ехр1293F, который имеет последовательность IgG1 дикого типа, процент заряженных гликанов и процент галактозилирования составляет примерно 0,5% и 15%-25% соответственно. Таким образом, белок, предлагаемый в изобретении, при его получении в клетках Ехр1293F предпочтительно имеет процент заряженных гликанов и процент галактозилирования, предпочтительно в диапазоне 0-4% и 5-45% соответственно.

Белки, предлагаемые в изобретении, содержащие шарнир, СН2- и СН3-участок тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина IgG1, имеющие по меньшей мере замену аминокислот, соответствующих аминокислотам в положениях L234, L235 и G236, предпочтительно на F, E и R соответственно, предпочтительно обладают способностью связываться с FcRn, сходную с Fc-областью человеческого IgG1 дикого типа. Должно быть очевидно, что замены, отобранные при создании изобретения, могут представлять собой замены, которые не влияют на связывающую функцию в отношении FcRn. Таким образом, фармакокинетика такого белка сходна с фармакокинетикой соответствующего белка, имеющего Fc-область человеческого IgG1 дикого типа, что описано, в том числе, в разделе "Примеры". Однако, как должно быть очевидно, может оказаться предпочтительным модифицировать FcRn-функцию, например, удлинять время полужизни или укорачивать время полужизни, в случаях, когда это могло быть желательно, что может предусматривать включение дополнительных замен. Для антител, таких, например, как полноразмерные моноспецифические или биспецифические антитела, в одном из вариантов осуществления изобретения способность связываться с человеческим FcRn не отличается от способности такого же антитела, имеющего Fc-область человеческого IgG1 дикого типа. Указанные способности к связыванию известны в данной области и их можно определять согласно методам, указанным в настоящем описании в разделе "Примеры". Таким образом, связывание FcRn

при рН 6,0 происходит аналогично тому, что имеет место для соответствующей Fc-области человеческого IgG1 дикого типа, а при рН 7,4 не происходит поддающееся обнаружение связывание.

В другом варианте осуществления изобретения белок, предлагаемый в изобретении, содержит указанные первый и второй полипептиды, которые имеют идентичные аминокислотные последовательности. Должно быть очевидно, что они включают белки, полученные из одной кассеты экспрессии, кодирующей один полипептид в клетке-хозяине, т.е. первый и второй полипептид могут являться гомодимерами указанного одного полипептида.

Пример указанного белка включает антитело, например, антитело, которое имеет две тяжелые цепи и две легкие цепи (см. фиг. 15А), в котором указанные две тяжелые цепи являются идентичными, так же как и обе легкие цепи. Такое антитело является двухвалентным и имеет две связывающие области, каждая из которых может связываться с одним и тем же антигеном-мишенью, т.е. одним и тем же эпитопом. Таким образом, в следующем варианте осуществления изобретения белок, предлагаемый в изобретении, содержит первый и второй полипептиды, где указанные первый и второй полипептиды представляют собой тяжелые цепи иммуноглобулина, которые являются идентичными по аминокислотной последовательности, и который содержит также первую и вторую легкие цепи иммуноглобулина, которые являются идентичными по аминокислотной последовательности.

В следующем варианте осуществления изобретения белок, предлагаемый в изобретении, дополнительно содержит замены. Предпочтительные дополнительные замены, предлагаемые в изобретении, включают модификации, которые обеспечивают образование гетеродимера, т.е. позволяют получать белок, содержащий первый и второй полипептиды, где первый и второй полипептиды являются различными. Пример такого белка включает биспецифическое антитело, например, антитело, которое имеет две тяжелые и две легкие цепи (см. фиг. 15Б), в котором по меньшей мере две тяжелые цепи не являются идентичными, в результате мишенью каждой включающей тяжелую цепь и легкую цепь пары в антителе являются различные антигены. Интродукция различных модификаций в шарнир, СН2- и СН3-участок последовательности IgG1 первого и второго полипептидов может быть необязательна, указанные

области первого и второго полипептидов могут быть идентичными. Таким путем можно создавать смеси гомодимеров и гетеродимеров, применение которых может само по себе давать преимущество, или гетеродимеры и гомодимеры в этой смеси можно легко разделять (например, благодаря различиям в размере и/или заряде, аффинности или т.п.). Однако предпочтительно интродуцировать дополнительные модификации, которые обеспечивают или способствуют созданию биспецифического антитела или т.п. Таким образом, белки, предлагаемые в изобретении, могут содержать дополнительные замены в шарнире, СН2- и СН3-участке в последовательности IgG1 первого и второго полипептидов. Таким путем первый и второй полипептиды, содержащие отличающиеся друг от друга последовательности в шарнире, СН2- и СН3-участке последовательности IgG1 можно успешно объединять в белке, предлагаемом в изобретении. Примеры таких белков, т.е. иммуноглобулинов или подобных иммуноглобулинам белков, имеющих такие замены, включают (но не ограничиваясь только ими) белки, имеющие комплементарные СН3-домены, такие как Triomab (триспецифические антитела, Триомаб)/Quadroma (квадрома) (фирма Trion Pharma/Fresenius Biotech; Roche, WO 2011/069104), антитела, полученные с помощью технологии "Knobs-into-Holes" (фирма Genentech, WO 98/50431), CrossMAb (фирма Roche, WO 2011/117329) и электростатически совместимые антитела (фирма Amgen, EP 1870459 и WO 2009/089004; фирма Chugai, US 201000155133; фирма Oncomed, WO 2010/129304), LUZ-Y (фирма Genentech), DIG-body и PIG-body (фирма Pharmabsine), доменное антитело, созданное путем обмена цепей (SEED-body)(фирма EMD Serono, WO 2007/110205), Biclomics (фирма Merus), FcΔAdp (фирма Regeneron, WO 2010/15792), биспецифические IgG1 и IgG2 (фирма Pfizer/Rinat, WO 11/143545), ассиметричный каркас (фирма Zymeworks/Merck, WO 2012/058768), МАт-Fv (фирма Xenacor, WO 2011/028952), двухвалентные биспецифические антитела (фирма Roche) и DuoBody (фирма Genmab A/S, WO 2011/131746).

В конкретном варианте осуществления изобретения в белке, предлагаемом в изобретении, указанные первый и второй полипептиды содержат дополнительную аминокислотную замену, предпочтительно замену аминокислоты, выбранной из группы, состоящей из Т366, L368, К370, D399, F405, Y407 и К409, такую как F405L или К409R. Должно быть очевидно, что,

когда белок представляет собой гомодимер, например, имеет идентичные первый и второй полипептиды, то они оба могут иметь одинаковые замены.

Такой белок, предлагаемый в изобретении, например, моноспецифическое антитело, может обладать значительным преимуществом при получении

5 биспецифического антитела, такого как описанное в разделе "Примеры" и в WO 2011/131746.

Таким образом, в дополнительном варианте осуществления изобретения белок, предлагаемый в изобретении, представляет собой моноспецифическое антитело. В контексте настоящего изобретения понятие "моноспецифический"

10 относится к белку, который связывается, т.е. обладает способностью связываться, с помощью его связывающих областей с одним и тем же эпитопом. В частности, такой моноспецифический белок или моноспецифическое антитело предпочтительно связывается с антигеном, выбранным из молекул-мишеней, клеточных мишеней и патогенов.

15 Молекулы-мишени, которые можно рассматривать, включают такие молекулы как цитокины, факторы роста, лиганды и т.п. Клеточные мишени, которые можно рассматривать, включают молекулы, расположенные на клеточной поверхности, такие как рецепторы или молекулы адгезии, например, присутствующие на раковых клетках, опухолевых клетках, эффекторных клетках  
20 (например, макрофагах, моноцитах, НК-клетках и Т-клетках). Патогены, которые могут являться мишенями, представляют собой вирусы, бактерии, простейшие, паразиты и т.п. Таким образом, белки, предлагаемые в изобретении, которые можно рассматривать, включают белки, такие как моноспецифические антитела, которые имеют связывающую область для антигена или мишени,  
25 выбранного/выбранной из группы, включающей цитокины, факторы роста, лиганды, раковые клетки, опухолевые клетки, эффекторные клетки, вирусы и бактерии.

Однако изобретение не ограничено моноспецифическими белками, такими как моноспецифические антитела, но относится также к мультиспецифическим  
30 белкам, таким как биспецифические антитела. В дополнительном варианте осуществления изобретения белок, предлагаемый в изобретении, представляет собой биспецифическое или мультиспецифическое антитело. Это означает, что связывающие области белка, предлагаемого в изобретении, связываются с

различными эпитопами, а не с одним и тем же эпитопом. Таким образом, первая и вторая связывающие области белка, предлагаемого в изобретении, являются различными, например, касательно аминокислотной последовательности.

5 Различные эпитопы могут представлять собой эпитопы одного и того элемента мишени, например, различные эпитопы, присутствующие в одной и той же молекуле-мишени, и/или присутствующие на одной и той же клетке-мишени, но могут представлять собой также эпитопы на различных элементах мишени.

Обладающий большим преимуществом биспецифический белок, предлагаемый в изобретении, такой как биспецифическое антитело, включает 10 белок, в котором мишенью одной из первой и второй связывающих областей является эффекторная клетка, а мишенью другой из первой и второй связывающих областей является раковый антиген. При применении такого мультиспецифического антитела специфический класс эффекторных клеток может взаимодействовать с раковой клеткой, тем самым, например, индуцируя 15 цитолиз раковой клетки эффекторной клеткой. Одним из вариантов осуществления изобретения является биспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, в котором одна из указанных связывающих областей связывается с раковым антигеном. В другом варианте осуществления изобретения одна из указанных связывающих областей связывается с эффекторной клеткой, такой как 20 Т-клетка, НК-клетка, макрофаг, дендритная клетка, моноцит или нейтрофил. Еще в одном варианте осуществления изобретения одна из указанных связывающих областей связывается с эффекторной клеткой, такой как Т-клетка или НК-клетка, а другая связывающая область связывается с раковым антигеном.

25 Существует целый ряд применений, таких как ингибирование рецептора или рекрутмент Т-клеток биспецифическими антителами, при которых Fc-связывание Fc-области терапевтических антител с эффекторными клетками или компонентом не требуется или даже является нежелательным, поскольку может приводить к нежелательной цитотоксичности. Так, биспецифическое антитело, 30 которое связывается с помощью одной связывающей области с человеческим Т-клеточным рецептором, может успешно вызывать рекрутмент человеческих цитотоксических Т-клеток. Таким образом, в настоящем описании предложено биспецифическое антитело, которое связывается с помощью одной связывающей

области с человеческим CD3 и которое может вызывать рекрутмент цитотоксических Т-клеток. Антитела к CD3, включая биспецифические антитела, с активирующей Fc-областью IgG могут индуцировать нежелательное агонистическое действие в присутствии опухолевых клеток из-за перекрестного сшивания экспрессирующими FcγR клетками, неправильной активации экспрессирующих FcγR клеток и последующего цитокинового шторма и связанных с ним токсических действий с помощью его связывающих областей, или агрегации тромбоцитов. Таким образом, биспецифические антитела к CD3 с неактивирующей Fc-областью являются ценными для предупреждения нежелательной активации клеток.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения по меньшей мере одна из первой и второй связывающих областей связывается с CD3, т.е. обладает способностью связываться с CD3. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная первая связывающая область связывается с CD3, а вторая связывающая область связывается, т.е. обладает способностью связываться, с любой другой представляющей интерес мишенью. Указанная другая мишень может представлять собой раковый антиген. Указанная другая мишень может представлять собой специфическую для опухоли мишень или специфическую для рака мишень. Предпочтительно указанный белок, предлагаемый в изобретении, представляет собой биспецифическое антитело. Указанный белок, представляющий собой биспецифическое антитело, предпочтительно имеет первую связывающую область, которая обладает способностью связываться с CD3, и имеет вторую связывающую область, которая обладает способностью связываться со специфической для рака мишенью.

Должно быть очевидно, что антитела, включая моноспецифические, биспецифические или мультиспецифические антитела, могут содержать Fc-область или подобную область, которая включает шарнирную область, CH2- и CH3-участок человеческого антитела IgG1-изотипа, предлагаемого в изобретении. Если формат антитела, такой как описанный в том числе ниже, не содержит такой Fc-области IgG1, такое антитело можно снабжать такой областью, например, путем замены Fc-области такого антитела Fc-областью с шарнирной областью, CH2- и CH3-участком, которая содержит FER,

предлагаемой в изобретении, или в случае, если такое антитело не содержит Fc-область, снабжать ею указанное антитело, например, посредством слияния и/или конъюгации. Таким образом, любой формат антитела подпадает под объем настоящего изобретения, если антитело содержит шарнирную область, СН2- и СН3-участок человеческого антитела IgG1-изотипа, предлагаемого в изобретении.

Примеры молекул биспецифических антител, которые можно применять в настоящем изобретении, содержат (I) индивидуальное антитело, которое имеет два плеча, содержащих различные антигенсвязывающие области, (II) одноцепочечное антитело, которое содержит специфичности, которые связываются с двумя различными эпитопами, например, посредством двух scFv, сцепленных в виде тандема с помощью дополнительного пептидного линкера; (III) антитело с двумя переменными доменами (DVD-Ig), в котором каждая легкая цепь и тяжелая цепь содержит два переменных домена в виде тандема, образованного с помощью короткой пептидной связи (Wu и др., *Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule*, в: *Antibody Engineering*, изд-во Springer Berlin Heidelberg, 2010); (IV) химически связанный биспецифический (Fab')<sub>2</sub>-фрагмент; (V) Tandab®, представляющее собой слияние двух одноцепочечных димерных антител, в результате чего образуется четырехвалентное биспецифическое антитело, имеющее два связывающих центра для каждого из антигенов-мишеней; (VI) флексибоди (flexibody), которое содержит комбинацию scFv с димерным антителом, в результате чего образуется многовалентная молекула; (VII) так называемую молекулу, созданную с использованием подхода «стыковка и блокировка» (Dock-and-Lock), основанную на «домене димеризации и стыковки» в протеинкиназе А, который при применении к Fab может приводить к образованию трехвалентного биспецифического связывающего белка, состоящего из двух идентичных Fab-фрагментов, сцепленных с другим Fab-фрагментом; (VIII) так называемая молекула Scorpion, содержащая, например, два scFv, присоединенных к обоим концам плеча человеческого Fab; и (IX) димерное антитело (диабоди).

В одном из вариантов осуществления изобретения биспецифическое антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, представляет собой димерное

антитело, кроссбоди (cross-body) или биспецифическое антитело, полученное посредством контролируемого обмена Fab-плечей (например, описанного в WO 2011/131746), например, указанные в настоящем изобретении.

Примеры различных классов биспецифических антител включают (но не ограничиваясь только ими) (I) IgG-подобные молекулы с комплементарными СН3-доменами для усиления гетеродимеризации; (II) рекомбинантные IgG-подобные молекулы двойного нацеливания, в которых каждое из двух плечей молекулы содержит Fab-фрагмент или часть Fab-фрагмента по меньшей мере двух различных антител; (III) слитые молекулы IgG, в которых полноразмерные антитела IgG-типа слиты с дополнительным Fab-фрагментом или частями Fab-фрагмента; (IV) слитые молекулы Fc, в которых одноцепочечные молекулы Fv или стабилизированные димерные антитела слиты с константными доменами тяжелых цепей, Fc-областями или их частями; (V) слитые молекулы Fab, в которых различные Fab-фрагменты, слитые друг с другом, слиты с константными доменами тяжелых цепей, Fc-областями или их частями; и (VI) антитела на основе scFv и димерных антител и тяжелых цепей (например, доменные антитела нанободи (Nanobodies)), в которых различные молекулы одноцепочечных Fv или различные димерные антитела, или различные тяжелые цепи антител (например, доменных антител, Nanobodies®) слиты друг с другом или с другим белком или молекулой-носителем, которые слиты с константными доменами тяжелых цепей, Fc-областями или их частями.

Примеры биспецифических IgG-подобных молекул или т.п. с комплементарными СН3-доменами включают (но не ограничиваясь только ими) (триспецифические антитела, Триомаб)/Quadroma (квадрома) (фирма Trion Pharma/Fresenius Biotech; Roche, WO 2011/069104), антитела, полученные с помощью технологии "Knobs-into-Holes" (фирма Genentech, WO 98/50431), CrossMAb (фирма Roche, WO 2011/117329) и электростатически совместимые антитела (фирма Amgen, EP 1870459 и WO 2009/089004; фирма Chugai, US 201000155133; фирма Oncomed, WO 2010/129304), LUZ-Y (фирма Genentech), DIG-body и PIG-body (фирма Pharmabsine), доменное антитело, созданное путем обмена цепей (SEED-body)(фирма EMD Serono, WO 2007/110205), Biclonics (фирма Merus), FcΔAdp (фирма Regeneron, WO 2010/15792), биспецифические IgG1 и IgG2 (фирма Pfizer/Rinat, WO 11/143545), ассиметричный каркас (фирма

Zymeworks/Merck, WO 2012/058768), МАТ-Fv (фирма Xencor, WO 2011/028952), двухвалентные биспецифические антитела (фирма Roche) и DuoBody (фирма Genmab A/S, WO 2011/131746).

5       Примеры рекомбинантных IgG-подобных молекул двойного нацеливания включают (но не ограничиваясь только ими) Ig двойного нацеливания ((DT)-Ig) (фирма GSK/Domantis), антитело «два в одном» (фирма Genentech), перекрестно сшитые МАТ (фирма Karmanos Cancer Center), mAb2 (фирма F-Star, WO 2008/003116), Zybodyes<sup>TM</sup> (фирма Zyngenia), антитела, созданные на основе подходов с общей легкой цепью (фирма Crucell/Merus, US 7262028), κλBodies 10 (фирма NovImmune) и CovX-body (фирма CovX/Pfizer).

      Примеры слитых молекул IgG включают (но не ограничиваясь только ими) Dual Variable Domain (DVD)-Ig<sup>TM</sup> (фирма Abbott, US 7612181), антитела с двумя доменами и двойной «головкой» (фирмы Unilever; Sanofi Aventis, WO 2010/0226923), IgG-подобные биспецифические антитела (фирма ImClone/Eli 15 Lilly), Ts2Ab (фирма MedImmune/AZ) и BsАт (фирма Zymogenetics), HERCULES (фирма Biogen Idec, US 007951918), scFv-слияние (фирма Novartis), scFv-слияние (фирма Changzhou Adam Biotech Inc, CN 102250246) и TvAb (фирма Roche, WO 2012/025525, WO 2012/025530).

      Примеры слитых молекул Fc включают (но не ограничиваясь только ими) 20 ScFv/Fc-слияния (фирма Academic Institution), SCORPION (фирма Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), антитела, созданные с помощью технологии перенацеливания (переориентации) двойной аффинности (Fc-DART<sup>TM</sup>), фирма MacroGenics, WO 2008/157379, WO 2010/080538) и Dual(ScFv)2-Fab (фирма National Research Center for Antibody Medicine – Китай).

25       Примеры биспецифических антител, содержащих слияние Fab, включают (но не ограничиваясь только ими) F(ab)<sub>2</sub> (фирма Medarex/AMGEN), антитела двойного действия или бис-Fab (фирма Genentech), Dock-and-Lock® (DNL) (фирма ImmunoMedics), двухвалентные биспецифические антитела (фирма Biotecnol) и Fab-Fv (фирма UCB-Celltech).

30       Примеры антител на основе scFv, димерных антител и доменных антител включают (но не ограничиваясь только ими) биспецифический активатор (проводник) Т-клеток (BiTE) (фирма Micromet), тандемное димерное антитело (Tandab) (фирма Affimed), антитела, созданные с помощью технологии

перенацеливания двойной аффинности (DART) (фирма MacroGenics),  
одноцепочечное димерное антитело (фирма Academic), TCR-подобные антитела  
(AIT, фирма ReceptorLogics), слияние ScFv с человеческим сывороточным  
альбумином (фирма Merrimack) и COMBODY (фирма Epigen Biotech), антитела  
5 двойного нацеливания (фирма Ablynx), антитела двойного нацеливания,  
содержащие только домен тяжелой цепи.

Следующим вариантом осуществления изобретения является  
биспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, в котором первый и  
второй полипептиды содержат дополнительные замены в указанных  
10 соответствующих CH2- и CH3-участках, в результате которых  
последовательности соответствующих CH2- и CH3-участков в указанных первом  
и втором полипептидах являются различными, указанные замены позволяют  
получать указанный полипептид, содержащий указанные первый и второй  
полипептиды. В конкретном варианте осуществления изобретения в указанном  
15 первом полипептиде по меньшей мере одна из аминокислот в положениях,  
соответствующих положению, выбранному из группы, которая состоит из T366,  
L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1,  
заменена, а в указанном втором полипептиде по меньшей мере одна из  
аминокислот в положениях, соответствующих положению, выбранному из  
20 группы, которая состоит из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в  
тяжелой цепи человеческого IgG1, заменена, при этом указанные замены в  
указанном первом и указанном втором полипептидах не находятся в одинаковых  
положениях. В этом контексте понятие "замененная" относится к аминокислоте  
в конкретном аминокислотном положении, которая заменена на аминокислоту  
25 другого типа. Таким образом, "замененная" аминокислота в положении,  
соответствующем положению в тяжелой цепи человеческого IgG1, означает, что  
аминокислота в конкретном положении отличается от встречающейся в  
естественных условиях аминокислоты в указанном положении в тяжелой цепи  
IgG1.

30 Кроме того, предложено биспецифическое антитело, предлагаемое в  
изобретении, в котором в указанном первом полипептиде по меньшей мере одна  
из аминокислот в положениях, соответствующих положению, выбранному из  
группы, которая состоит из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в

тяжелой цепи человеческого IgG1, заменена, и в указанном втором полипептиде по меньшей мере одна из аминокислот в положениях, соответствующих положению, выбранному из группы, которая состоит из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1, заменена, и при этом  
5 указанные замены в указанном первом и указанном втором полипептидах не находятся в одинаковых положениях.

В следующем варианте осуществления изобретения аминокислота в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи человеческого IgG1, представляет собой L в указанном первом полипептиде, и аминокислота в  
10 положении, соответствующем K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1, представляет собой R в указанном втором полипептиде, или наоборот.

Другим вариантом осуществления изобретения является биспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, в котором аминокислота в положении, соответствующем F405, представляет собой L в указанном первом полипептиде,  
15 и аминокислота в положении, соответствующем K409, представляет собой R в указанном втором полипептиде, или наоборот. Другим вариантом осуществления изобретения является биспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, в котором аминокислота в положении, соответствующем F405 и K409, обозначает L и K соответственно, в указанном первом полипептиде, и  
20 котором аминокислота в положении, соответствующем F405 и K409, обозначает F и R соответственно, в указанном втором полипептиде, или наоборот.

Следующим вариантом осуществления изобретения является биспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, где указанное биспецифическое антитело имеет модификации в обоих указанных первом и  
25 втором полипептидах, включающие замены аминокислот в положениях L234, L235 и G236 на F, E и R, и замены аминокислоты в положении F405 на L в указанном первом полипептиде и K409 на R в указанном втором полипептиде, или наоборот.

Одним из вариантов осуществления изобретения является биспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, где указанное биспецифическое антитело имеет модификации в одном из указанного первого и указанного второго  
30 полипептида, включающие замены аминокислот в положениях L234, L235 и G236 на F, E и R, и замены аминокислот в положении F405 на L в указанном

первом полипептиде и К409 на R в указанном втором полипептиде, или наоборот.

Следующим вариантом осуществления изобретения является биспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, где указанное биспецифическое антитело имеет модификации в указанных первом и втором полипептидах, включающие замены аминокислот в положениях L234, L235 и G236 на F, E и R в первом полипептиде и замене в указанном втором полипептиде аминокислот в положениях L234, L235 и D265 на F, E и A, и замены аминокислот в положении F405 на L в указанном первом полипептиде и К409 на R в указанном втором полипептиде.

Следующим вариантом осуществления изобретения является биспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, где указанное биспецифическое антитело имеет модификации в указанных первом и втором полипептидах, включающие замены аминокислот в положениях L234, L235 и G236 на F, E и R в первом полипептиде и замены в указанном втором полипептиде аминокислот в положениях L234, L235 и D265 на F, E и A, и замены аминокислот в положении F405 на L в указанном втором полипептиде и К409 на R в указанном первом полипептиде.

Следующим вариантом осуществления изобретения является биспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, где указанное биспецифическое антитело имеет модификации в обоих указанных первом и втором полипептидах, состоящие из замен аминокислот в положениях L234, L235 и G236 на F, E и R, и замен аминокислот в положении F405 на L в указанном первом полипептиде и К409 на R в указанном втором полипептиде, или наоборот.

Одним из вариантов осуществления изобретения является биспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, где указанное биспецифическое антитело имеет модификации в одном из указанного первого и указанного второго полипептида, состоящие из замен аминокислот в положениях L234, L235 и G236 на F, E и R, и замен аминокислот в положении F405 на L в указанном первом полипептиде и К409 на R в указанном втором полипептиде, или наоборот.

Следующим вариантом осуществления изобретения является биспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, где указанное

биспецифическое антитело имеет модификации в указанных первом и втором полипептидах, состоящие из замен аминокислот в положениях L234, L235 и G236 на F, E и R в указанном первом полипептиде и замен в указанном втором полипептиде аминокислот в положениях L234, L235 и D265 на F, E и A, и замен аминокислот в положении F405 на L в указанном первом полипептиде и K409 на R в указанном втором полипептиде.

Еще одним осуществлением изобретения является биспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, где указанное биспецифическое антитело имеет модификации в указанных первом и втором полипептидах, состоящие из замен аминокислот в положениях L234, L235 и G236 на F, E и R в указанном первом полипептиде и замен в указанном втором полипептиде аминокислот в положениях L234, L235 и D265 на F, E и A, и замен аминокислот в положении F405 на L в указанном втором полипептиде и K409 на R в указанном первом полипептиде.

Основой указанного белка, предлагаемого в изобретении, могут являться шарнир, CH2- и CH3-участок человеческого IgG1, указанного в SEQ ID NO: 1. Указанные шарнир, CH2- и CH3-участок человеческого IgG1 соответствуют аллотипу IgG1m(f). Естественно, можно рассматривать любой другой аллотип человеческого иммуноглобулина IgG1-изотипа (например, IgG1m(za), IgG1m(zax), IgG1m(zav) или IgG1m(fa); см. в том числе Vidarsson и др., *Front. Immunol.*, 20 октября 2014 г. и представленные в базе данных IMGT ([www.imgt.org](http://www.imgt.org))), и их можно применять эквивалентным образом.

Fc-области могут иметь на их C-конце лизин. Источником этого лизина является встречающаяся в естественных условиях последовательность, присутствующая в человеческих антителах, из которой имеют происхождение указанные Fc-области. При получении в клеточной культуре рекомбинантных антител, указанный лизин может отщепляться в результате протеолиза эндогенной(ыми) карбоксипептидазой(ами), что приводит к образованию константной области, имеющей такую же последовательность, но лишенную C-концевого лизина. Для целей получения антител ДНК, кодирующая указанный концевой лизин, может быть исключена из последовательности, в результате получают антитела без лизина. Антитела, полученные из нуклеотидных последовательностей, которые кодируют или не кодируют концевой лизин,

являются практически идентичными по последовательности и функции, поскольку степень процессинга концевой лизина, как правило, является высокой, например, при использовании антител, полученных в производственных системах на основе CHO-клеток (Dick L.W. и др., Biotechnol. Bioeng. 100, 2008, сс. 1132–1143). Последовательности константных областей, указанных в настоящем описании, содержат концевой лизин (K) (см. в том числе SEQ ID NO: 1), и последовательности, кодирующие концевой лизин (K), использовали в разделе "Примеры" в настоящем описании. Таким образом, должно быть очевидно, что белки, предлагаемые в изобретении, такие как антитела, можно создавать без кодирования или присутствия в них концевой лизина, что представлено в настоящем описании в SEQ ID NO: 1-3, 5 и 9-14.

Таким образом, белок, предлагаемый в изобретении, или биспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, может содержать первый и второй полипептиды, которые содержат аминокислотную последовательность, указанную в настоящем описании в SEQ ID NO: 1, где указанные первый и второй белки имеют аминокислотные замены, указанные в настоящем описании. В белке, предлагаемом в изобретении, или биспецифическом антителе, предлагаемом в изобретении, указанные первый и второй полипептиды предпочтительно содержат аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, где указанная аминокислотная последовательность, которая содержится в указанных первом и втором полипептидах, имеет аминокислотные замены, указанные в настоящем описании. Кроме того, указанные аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1, которые имеют замены, указанные в настоящем описании, могут не содержать концевой лизин.

Таким образом, белок или моноспецифическое, или биспецифическое антитело, которые могут представлять собой полноразмерное антитело, предлагаемое в изобретении, может содержать аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2. Предлагаемый в изобретении белок, помимо того, что он содержит указанные замены L234, L235 и G236 на F, E и R в последовательности шарнира, СН2- и СН3-участка может содержать дополнительные замены. Предпочтительно количество дополнительных замен составляет вплоть до 5 дополнительных замен в шарнире, СН2- и СН3-участке

тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина IgG1. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения белок, который содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2, содержит дополнительные замены в указанной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, при этом количество дополнительных замен составляет вплоть до 5 замен. Другим вариантом осуществления изобретения является белок, предлагаемый в изобретении, который содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, содержит дополнительные замены в указанной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, при этом количество дополнительных замен составляет вплоть до 10 замен. В другом варианте осуществления изобретения белок, предлагаемый в изобретении, может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, или соответствующую последовательность другого аллотипа человеческого IgG1, и может включать указанные замены L234, L235 и G236 на F, E и R в шарнире, CH2- и CH3-участке, и может содержать также дополнительные замены, например, включать вплоть до 5 дополнительных замен. Примеры такого белка, содержащего полипептид, представленный в SEQ ID NO: 2 с дополнительными заменами, которые представляют собой очень ценные дополнительные замены, например, имеющего замены R/L, указанные в настоящем описании, представлены в виде аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 11 и 12. Кроме того, указанные аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 2 или 11 и 12, которые имеют необязательные дополнительные замены, указанные в настоящем описании, могут представлять собой последовательности с делецией концевого лизина.

Кроме того, согласно изобретению предложен белок, который может представлять собой антитело или полноразмерное антитело, указанное в настоящем описании, в котором и первый, и второй полипептиды содержат аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 11 или 12.

В другом варианте осуществления изобретения предложен белок, который может представлять собой биспецифическое антитело, указанное в настоящем описании, в котором первый и второй полипептиды содержат аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2 и 3 соответственно. В

другом варианте осуществления изобретения предложен белок, который может представлять собой биспецифическое антитело, указанное в настоящем описании, в котором первый и второй полипептиды содержат аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11 и 12 соответственно или 11 и 14, или 12 и 13. Указанные полипептиды могут содержать СН1-участок, примыкающий к шарнирной области, например, человеческий СН1-участок, представленный в SEQ ID NO: 4.

В следующем варианте осуществления изобретения белок или моноспецифическое, или биспецифическое антитело, полученный/полученное согласно изобретению, содержит аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 85%, например, идентична по меньшей мере на 90%, идентична по меньшей мере на 95%, идентична по меньшей мере на 97%, идентична по меньшей мере на 98%, идентична по меньшей мере на 99% или идентична на 100% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, в которой аминокислотные остатки в положениях, соответствующих 234, 235 и 236 согласно Eу-нумерации, представляют собой F, E и R соответственно.

В следующем варианте осуществления изобретения белок или моноспецифическое, или биспецифическое антитело, полученный/полученное согласно изобретению, содержит аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 85%, например, идентична по меньшей мере на 90%, идентична по меньшей мере на 95%, идентична по меньшей мере на 97%, идентична по меньшей мере на 98%, идентична по меньшей мере на 99% или идентична на 100% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11, в которой аминокислотные остатки в положениях, соответствующих 234, 235 и 236 согласно Eу-нумерации, представляют собой F, E и R соответственно, и аминокислотный остаток в положении, соответствующем 405, представляет собой L; где аминокислоты пронумерованы согласно Eу-нумерации.

В следующем варианте осуществления изобретения белок или моноспецифическое, или биспецифическое антитело, полученный/полученное согласно изобретению, содержит аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 85%, например, идентична по меньшей мере на 90%, идентична по меньшей мере на 95%, идентична по меньшей мере на 97%, идентична по меньшей мере на 98%, идентична по меньшей мере на 99% или

идентична на 100% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 12, в которой аминокислотные остатки в положениях, соответствующих 234, 235 и 236 согласно Eу-нумерации, представляют собой F, E и R соответственно, и аминокислотный остаток в положении, соответствующем 409, представляет собой R; где аминокислоты пронумерованы согласно Eу-нумерации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения белок или биспецифическое антитело, полученный/полученное согласно изобретению, содержит первый и второй полипептиды, где

указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 85%, например, идентична по меньшей мере на 90%, идентична по меньшей мере на 95%, идентична по меньшей мере на 97%, идентична по меньшей мере на 98%, идентична по меньшей мере на 99% или идентична на 100% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, в которой аминокислотные остатки в положениях, соответствующих 234, 235 и 236, представляют собой F, E и R соответственно,

и

указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 85%, например, идентична по меньшей мере на 90%, идентична по меньшей мере на 95%, идентична по меньшей мере на 97%, идентична по меньшей мере на 98%, идентична по меньшей мере на 99% или идентична на 100% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, в которой аминокислотные остатки в положениях, соответствующих 234, 235 и 236, представляют собой F, E и A соответственно;

где аминокислоты пронумерованы согласно Eу-нумерации.

В следующих вариантах осуществления изобретения белок или биспецифическое антитело, полученный/полученное согласно изобретению, содержит первый и второй полипептиды, где

указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 85%, например, идентична по меньшей мере на 90%, идентична по меньшей мере на 95%, идентична по меньшей мере на 97%, идентична по меньшей мере на 98%,

идентична по меньшей мере на 99% или идентична на 100% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11, в которой аминокислотные остатки в положениях, соответствующих 234, 235 и 236, представляют собой F, E и R соответственно, и аминокислотный остаток в положении, соответствующем 405, представляет собой L;

и

указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 85%, например, идентична по меньшей мере на 90%, идентична по меньшей мере на 95%, идентична по меньшей мере на 97%, идентична по меньшей мере на 98%, идентична по меньшей мере на 99% или идентична на 100% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 12, в которой аминокислотные остатки в положениях, соответствующих 234, 235 и 236, представляют собой F, E и R соответственно, и аминокислотный остаток в положении, соответствующем 409, представляет собой R;

где аминокислоты пронумерованы согласно Eи-нумерации.

В следующих вариантах осуществления изобретения белок или биспецифическое антитело, полученный/полученное согласно изобретению, содержит первый и второй полипептиды, где

указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 85%, например, идентична по меньшей мере на 90%, идентична по меньшей мере на 95%, идентична по меньшей мере на 97%, идентична по меньшей мере на 98%, идентична по меньшей мере на 99% или идентична на 100% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 12, в которой аминокислотные остатки в положениях, соответствующих 234, 235 и 236, представляют собой F, E и R соответственно, и аминокислотный остаток в положении, соответствующем 409, представляет собой R;

и

указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 85%, например, идентична по меньшей мере на 90%, идентична по меньшей мере на 95%, идентична по меньшей мере на 97%, идентична по меньшей мере на 98%,

идентична по меньшей мере на 99% или идентична на 100% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13, в которой аминокислотные остатки в положениях, соответствующих 234, 235 и 236, представляют собой F, E и A соответственно, и аминокислотный остаток в положении, соответствующем 405, представляет собой L;

где аминокислоты пронумерованы согласно Eу-нумерации.

В следующих вариантах осуществления изобретения белок или биспецифическое антитело, полученный/полученное согласно изобретению, содержит первый и второй полипептиды, где

указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 85%, например, идентична по меньшей мере на 90%, идентична по меньшей мере на 95%, идентична по меньшей мере на 97%, идентична по меньшей мере на 98%, идентична по меньшей мере на 99% или идентична на 100% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11, в которой аминокислотные остатки в положениях, соответствующих 234, 235 и 236, представляют собой F, E и R соответственно, и аминокислотный остаток в положении, соответствующем 405, представляет собой L;

и

указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 85%, например, идентична по меньшей мере на 90%, идентична по меньшей мере на 95%, идентична по меньшей мере на 97%, идентична по меньшей мере на 98%, идентична по меньшей мере на 99% или идентична на 100% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14, в которой аминокислотные остатки в положениях, соответствующих 234, 235 и 236, представляют собой F, E и A соответственно, и аминокислотный остаток в положении, соответствующем 409, представляет собой R;

где аминокислоты пронумерованы согласно Eу-нумерации.

Последовательности, представленные в SEQ ID NO: 2 в настоящем описании, содержат шарнир, CH<sub>2</sub>- и CH<sub>3</sub>-участок человеческого IgG1 аллотпа G1m(f) с заменами L234, L235 и G236 на F, E и R. Предложены соответствующие последовательности константных областей (каждая из которых включает CH<sub>1</sub>-

участок) других аллотипов человеческого IgG1 с указанными заменами L234, L235 и G236 на F, E и R в последовательности шарнира, CH2- и CH3-участка, представленной в виде SEQ ID NO: 27 (CH1, шарнир, CH2- и CH3-участок человеческого IgG1 аллотипа G1m(fa) с FER-заменами), SEQ ID NO: 29 (CH1, шарнир, CH2- и CH3-участок человеческого IgG1 аллотипа G1m(za) с FER-заменами), SEQ ID NO: 31 (CH1, шарнир, CH2- и CH3-участок человеческого IgG1 аллотипа G1m(zav) с FER-заменами), SEQ ID NO: 33 (CH1, шарнир, CH2- и CH3-участок человеческого IgG1 аллотипа G1m(zax) с FER-заменами). В другом варианте осуществления изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая указанный первый или второй полипептид, указанный в настоящем описании, где указанные первый и второй полипептиды оба содержат указанную замену аминокислот, соответствующих аминокислотам L234, L235 и G236, наиболее предпочтительно где указанные замены в положениях L234, L235 и G236 представляют собой F, E и R соответственно. В следующем варианте осуществления изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая указанный первый или второй полипептид, указанный в настоящем описании, где указанный первый или второй полипептид содержит указанную замену аминокислот, соответствующих аминокислотам L234, L235 и G236, предпочтительно где указанные замены в положениях L234, L235 и G236 представляют собой F, E и R соответственно.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая первый или второй полипептид, где указанный первый или второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 11 или 12. Указанные нуклеиновые кислоты могут кодировать также полипептид, содержащий CH1-участок, примыкающий к шарнирной области, например, CH1-участок, представленный в SEQ ID NO: 4. Предпочтительно указанная нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь иммуноглобулина. Указанная тяжелая цепь иммуноглобулина наиболее предпочтительно содержит человеческую или гуманизованную переменную область иммуноглобулина. В указанной нуклеиновой кислоте, кодирующей первый или второй полипептид, из кодирующей последовательности может быть удален в результате делеции кодон концевого лизина. Указанные нуклеиновые

кислоты можно объединять с нуклеиновой кислотой, кодирующей легкую цепь иммуноглобулина или т.п.

Одним из вариантов осуществления изобретения является способ, предлагаемый в изобретении, создания конструкции для получения белка, предлагаемого в изобретении, с неактивирующей Fc-областью, где указанный белок содержит первый и второй полипептиды с Fc-областью, которая содержит шарнирную область, СН2- и СН3-участок, представленную в SEQ ID NO: 1, или т.п., указанный способ включает стадии, на которых:

а) получают конструкцию или конструкции для экспрессии первого и/или второго полипептида(ов), которая/которые содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность первого и/или второго полипептида(ов), которая содержит шарнирную область, СН2-участок и СН3-участок;

б) модифицируют указанную нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислоты, соответствующие аминокислотам L234, L235 и G236 в шарнирной области, СН2-участке и СН3-участке, так, чтобы она кодировала F, E и R соответственно;

в) тем самым создают конструкцию или конструкции для получения белка с неактивирующей Fc-областью.

Другим вариантом осуществления изобретения является способ, предлагаемый в изобретении, создания конструкции для получения белка с неактивирующей Fc-областью, где указанный белок содержит первый и второй полипептиды с Fc-областью, которая содержит шарнирную область, СН2- и СН3-участок, представленную в SEQ ID NO: 1, или т.п., указанный способ включает стадии, на которых:

а) получают нуклеотидную последовательность, кодирующую шарнирную область, СН2-участок и СН3-участок, представленную в SEQ ID NO: 1;

б) модифицируют указанную нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислоты, соответствующие аминокислотам L234, L235 и G236 в шарнирной области, СН2-участке и СН3-участке, так, чтобы она кодировала F, E и R соответственно;

в) создают конструкцию с использованием модифицированной последовательности, полученной на стадии б), для экспрессии первого и/или

второго полипептида(ов) белка, предлагаемого в изобретении, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую указанный(ые) первый и/или второй полипептид(ы), содержащий(ие) шарнирную область, СН2-участок и СН3-участок с аминокислотами L234, L235 и G236 в шарнирной области, СН2-участке и СН3-участке, модифицированную так, чтобы кодировать F, E и R соответственно, получая тем самым конструкцию для получения белка, предлагаемого в изобретении, с неактивирующей Fc-областью.

Следующим вариантом осуществления изобретения является способ создания конструкции для получения антитела с неактивирующей Fc-областью, где указанное антитело содержит тяжелую цепь с Fc-областью, которая содержит шарнирную область, СН2- и СН3-участок, представленную в SEQ ID NO: 1 или т.п., указанный способ включает стадии, на которых:

а) создают конструкцию для экспрессии тяжелой цепи антитела, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела, которая содержит шарнирную область, СН2-участок и СН3-участок;

б) модифицируют указанную нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислоты, соответствующие аминокислотам L234, L235 и G236 в шарнирной области, СН2-участке и СН3-участке, так, чтобы она кодировала F, E и R соответственно;

в) тем самым создают конструкцию для получения антитела с неактивирующей Fc-областью.

Следующим вариантом осуществления изобретения является способ создания конструкции для получения антитела с неактивирующей Fc-областью, где указанное антитело содержит тяжелую цепь с Fc-областью, которая содержит шарнирную область, СН2- и СН3-участок, представленную в SEQ ID NO: 1, или т.п., указанный способ включает стадии, на которых:

а) создают нуклеотидную последовательность, которая кодирует шарнирную область, СН2-участок и СН3-участок, представленную в SEQ ID NO: 1;

б) модифицируют указанную нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислоты, соответствующие аминокислотам L234, L235 и

G236 в шарнирной области, СН2-участке и СН3-участке, так, чтобы кодировала F, E и R соответственно;

5 в) создают конструкцию с использованием модифицированной последовательности, полученной на стадии б), для экспрессии тяжелой цепи антитела, содержащую нуклеотидную последовательность, которая кодирует последовательность тяжелой цепи антитела, содержащую шарнирную область, СН2-участок и СН3-участок с аминокислотами L234, L235 и G236 в шарнирной области, СН2-участке и СН3-участке, модифицированную так, чтобы кодировать F, E и R соответственно, получая тем самым конструкцию для получения антитела с неактивирующей Fc-областью.

10 Должно быть очевидно, что в указанных выше способах создания конструкций полипептид или тяжелая цепь с Fc-областью, которая содержит шарнирную область СН2- и СН3-участок, может представлять собой любую указанную в настоящем описании Fc-область, которая содержит шарнирную область, СН2- и СН3-участок, предлагаемую в изобретении. Указанные способы являются особенно ценными для улучшения профиля безопасности или подавления опосредуемой Fc эффекторной функции антитела путем интродукции FER-замен. Указанные способы являются ценными для улучшения профиля безопасности белка, антитела или т.п. путем интродукции указанных FER-замен. Указанные способы также являются ценными для подавления опосредуемой Fc эффекторной функции белка, антитела или т.п. путем интродукции FER-замен. Указанные способы являются особенно ценными для улучшения профиля безопасности и подавления опосредуемой Fc эффекторной функции белка, антитела или т.п. путем интродукции FER-замен. С помощью указанных способов можно создавать нуклеиновые кислоты, с использованием которых получать белки с предлагаемой в изобретении Fc-областью, которая содержит шарнирную область, СН2- и СН3-участок.

25 Указанные нуклеиновые кислоты являются особенно ценными для получения белков, предлагаемых в изобретении, таких, например, как антитело, содержащее тяжелые и легкие цепи, которые содержат указанные в настоящем описании первый и второй полипептиды, предлагаемые в изобретении. Указанные антитела могут представлять собой моноспецифические антитела и биспецифические антитела. Таким образом, другим объектом изобретения

30

являются нуклеиновые кислоты, кодирующие указанный первый или второй полипептид, предлагаемый в изобретении, предназначенные для применения в экспрессионных векторах, кодирующих последовательности, например, антитело. Таким образом, предложены клетки-хозяева, содержащие указанные экспрессионные векторы, включая гибридомы, которые могут продуцировать антитела, и способы получения указанного антитела путем культивирования таких клеток-хозяев или гибридом в соответствующих условиях, в которых белок, предлагаемый в изобретении, такой как антитело, получают и необязательно извлекают.

10           Таким образом, можно получать клетку-хозяина с нуклеиновой кислотой, предлагаемой в изобретении, в которой указанная нуклеиновая кислота включена в экспрессионный вектор, например, описанный в разделе "Примеры" или т.п. В контексте настоящего изобретения экспрессионный вектор может представлять собой любой пригодный вектор, включая хромосомные, 15 нехромосомные и синтетические нуклеотидные векторы (нуклеотидная последовательность, которая содержит приемлемый набор контролирующей экспрессию элементов). Примеры указанных векторов включают производные SV40, бактериальные плазмиды, фаговую ДНК, бакуловирус, плазмиды на основе дрожжей, векторы, полученные из комбинаций плазмид и фаговой ДНК, 20 и векторы на основе вирусной или невирусной нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК). В одном из вариантов осуществления изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, находится в векторе, представляющем собой голую ДНК или РНК, который содержит, например, элемент для линейной экспрессии (как описано, например, у Sykes и Johnston, Nat Biotech 17, 1997, сс. 355-359), 25 компактном нуклеотидном векторе (описанном, например, в US 6077835 и/или WO 00/70087), плазмидном векторе, таком как pсDNA3.3 (представлен в настоящем описании), pBR322, pUC 19/18 или pUC 118/119, нуклеотидном векторе минимального размера, «мошке» (описанном, например, у Schakowski и др., Mol Ther 3, 2001, сс. 793-800), векторной конструкции в виде осажденной 30 нуклеиновой кислоты, такой как  $\text{CaPO}_4^-$ -осажденная конструкция (описанная, например, в WO 00/46147, у Benvenisty и Reshef, PNAS USA 83, 1986, сс. 9551-9555, Wigler и др., Cell 14, 1978, с. 725 и у Coraro и Pearson, Somatic Cell

Genetics 7, 1981, с. 603). Указанные нуклеотидные векторы и их применение хорошо известны в данной области (см., например, US 5589466 и US 5973972).

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения вектор можно применять для экспрессии в бактериальной клетке. Примеры указанных векторов включают такие экспрессионные векторы как BlueScript (фирма Stratagene), рIN-векторы, описанные у Van Heeke и Schuster, J Biol Chem 264, 1989, сс. 5503-5509, рЕТ -векторы (фирма Novagen, Мэдисон, шт. Висконсин) и т.п. В другом или альтернативном варианте экспрессионный вектор может представлять собой вектор, пригодный для экспрессии в дрожжевой системе. Можно применять любой вектор, пригодный для экспрессии в дрожжевой системе. Приемлемые векторы включают, например, векторы, содержащие конститутивные или индуцибельные промоторы, такие как промоторы альфа-фактора, алкогольоксидазы и PGH (см., обзор в: Current Protocols in Molecular Biology, под ред. F. Ausubel и др., изд-во Greene Publishing and Wiley InterScience New York, 1987, и у Grant и др., Methods in Enzymol 153, 1987, сс. 516-544).

Нуклеиновая кислота и/или вектор может содержать также нуклеотидную последовательность, которая кодирует последовательность секреции/локализации, которая может обеспечивать направленный перенос полипептида, такого как кодируемая полипептидная цепь, в периплазматическое пространство или в среды для культивирования клеток. Указанные последовательности известны в данной области и включают лидерные или сигнальные пептиды секреции, последовательности, обеспечивающие направленный перенос в органеллы (например, последовательности ядерной локализации, сигналы удержания в ER, транзитные последовательности митохондрий, транзитные последовательности хлоропластов), последовательности мембранной локализации/якорные последовательности (например, последовательности остановки переноса, якорные GPI-последовательности) и т.п.

В экспрессионном векторе, предлагаемом в изобретении, нуклеиновые кислоты, предлагаемые в изобретении, могут содержать или могут быть связаны с любым приемлемым промотором, энхансером и другими облегчающими экспрессию элементами. Примеры указанных элементов включают сильные

промоторы экспрессии (например, немедленно-ранний промотор/энхансер человеческого цитомегаловируса (CMV IE), а также промоторы RSV, SV40, SL3 3, MMTV и ВИЧ LTR), эффективные поли(A) терминирующие последовательности, сайт инициации репликации плазмидного продукта в *E. coli*, ген, обуславливающий устойчивость к антибиотикам в качестве селектируемого маркера и/или пригодный приемлемый сайт клонирования (например, полилинкер). Нуклеиновые кислоты могут содержать также индуцибельный промотор, отличающийся от конститутивного промотора, такого как CMV IE (специалисту в данной области должно быть очевидно, что 10 указанные понятия применяют для описания уровня экспрессии генов в определенных условиях).

Таким образом, предложены нуклеотидные последовательности, кодирующие антитело, предлагаемое в изобретении, где указанное антитело содержит тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую по меньшей мере шарнирную область, СН2-участок и СН3-участок соответственно тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина IgG1, которая содержит замены аминокислот в положениях L234, L235 и G236 на F, E и R соответственно, и легкую цепь иммуноглобулина. Указанная клетка-хозяин может быть особенно ценной для получения моноспецифического антитела, которое имеет две идентичные 20 тяжелые цепи, содержащие указанные первый и второй полипептиды, и две идентичные легкие цепи, такие как указанные в настоящем описании. В частности, когда получают два из таких антител, в которых последовательности тяжелых цепей отличаются друг от друга, и это позволяет осуществлять обмен плечей, такой, как описанный в разделе "Примеры", то указанные два антитела 25 можно с большим успехом использовать для получения биспецифического антитела.

Как указано, может не требоваться, чтобы и первый, и второй полипептиды биспецифического антитела оба имели одинаковые замены в положениях L234, L235 и G236 на F, E и R. Например, одно из них может иметь замены, отличные 30 от замен другого. Это позволяет, например, успешно получать биспецифические антитела, поскольку необязательно создавать каждый раз, например, новую конструкцию и/или клеточную линию для скрининга различных комбинаций антител, из которых можно получать и/или разрабатывать в качестве нового

продукта биспецифического антитела, тем самым значительное экономя время и усилия.

Таким образом, одним из вариантов осуществления изобретения является способ получения биспецифического антитела, предлагаемого в изобретении,

5 где способ включает:

а) получения первого антитела, содержащего

а. тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую по меньшей мере шарнирную область, СН2-участок и СН3-участок соответственно тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина IgG1, содержащий замены аминокислот в  
10 положениях L234, L235 и G236 на F, E и R соответственно,

б. легкую цепь иммуноглобулина;

б) получение второго антитела, содержащего

а. тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую по меньшей мере шарнирную область, СН2-участок и СН3-участок соответственно тяжелой цепи  
15 человеческого иммуноглобулина IgG1, содержащую замены аминокислот в  
- положениях L234, L235 и D265, где предпочтительно указанные замены представляют собой F, E и A соответственно,

или

- содержащую замены аминокислот в положениях L234, L235 и G236 на F,  
20 E и R соответственно,

б. легкую цепь иммуноглобулина;

в) где последовательности указанных первого и второго СН3-участков в указанных соответствующих первом и втором антителах являются различными и являются такими, что гетеродимерное взаимодействие между указанным первым  
25 и вторым СН3-участками сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанного первого и второго СН3-участков;

г) инкубацию указанного первого антитела с указанным вторым антителом в восстанавливающих условиях, достаточных для того, чтобы обеспечивать изомеризацию цистеинов в шарнирных областях по дисульфидной связи; и

30 д) получение биспецифического антитела, содержащего указанную первую тяжелую цепь иммуноглобулина и указанную первую легкую цепь иммуноглобулина указанного первого антитела и указанную вторую тяжелую

цепь иммуноглобулина и указанную вторую легкую цепь иммуноглобулина указанного второго антитела.

В дополнительном варианте осуществления изобретения вместо биспецифического антитела можно получать мультиспецифические антитела.

5 Должно быть очевидно, что первое и второе антитела, полученные на стадиях а) и б), предпочтительно представляют собой моноспецифические антитела. Более предпочтительно указанные моноспецифические антитела представляют собой полноразмерные антитела. Наиболее предпочтительно  
10 указанные антитела содержат человеческие или гуманизированные переменные области и имеют человеческие константные области, которые содержат замены, указанные в настоящем описании. Примерами первого и второго антител, которые являются весьма ценными для применения в описанном выше способе, являются первое и второе антитела, которые содержат аминокислотную последовательность, представленную соответственно в SEQ ID  
15 NO: 11 и 12; 11 и 14 или 12 и 13. Указанные методы получения биспецифического антитела описаны, в том числе, в разделе "Примеры" в настоящем описании, а также известны из другого источника (Labrijn и др., Nature Protocols 9(10), октябрь 2014 г., сс. 2450-2463). Естественно, на стадии в) можно рассматривать другие приемлемые различия, такие как указанные в  
20 настоящем описании.

#### Фармацевтические композиции

Одним из объектов изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая белок, такой как антитело, указанный в любых объектах и вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании,  
25 и фармацевтически приемлемый носитель.

Фармацевтические композиции можно приготавливать с фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями, а также с любыми другими известными адъювантами и эксципиентами в соответствии с общепринятыми методами, например, описанными у Remington: The Science and Practice of  
30 Pharmacy, 19-ое изд., под ред. Gennaro, изд-во Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995.

Фармацевтически приемлемые носители или разбавители, а также любые другие известные в данной области адъюванты и эксципиенты должны быть

приемлемыми для белка, варианта или антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, и выбранного пути введения. Приемлемость носителей и других компонентов фармацевтических композиций определяют на основе отсутствия существенного отрицательного воздействия на требуемые биологические свойства выбранного соединения или выбранной фармацевтической композиции, предлагаемого/предлагаемой в настоящем изобретении (например, воздействия, ниже существенного уровня (10% или менее относительно ингибирования, 5% или менее относительно ингибирования и т.д.) на связывание антигена.

Фармацевтическая композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, может включать также разбавители, наполнители, соли, буферы, поверхностно-активные вещества (например, неионогенное поверхностно-активное вещество, такое как Твин-20 или Твин-80), стабилизаторы (например, сахара или аминокислоты, не входящие в состав белков), консерванты, агент для фиксации тканей, солубилизаторы и/или другие вещества, пригодны для включения в фармацевтическую композицию.

Фактические уровни доз действующих веществ в фармацевтических композициях, предлагаемых в настоящем изобретении, можно варьировать так, чтобы получать количество действующего вещества, которое является эффективным для достижения требуемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и пути введения, не являясь при этом токсичным для пациента. Выбранный уровень доз должен зависеть от различных фармакокинетических факторов, включая активность конкретных композиций, применяемых в настоящем изобретении, или их амида, пути введения, времени введения, скорости выведения конкретного применяемого соединения, продолжительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или продуктов, применяемых в комбинации с конкретными применяемыми композициями, возраста, пола, веса тела, общего состояния здоровья и предыдущей истории болезни пациента, подлежащего лечению, и подобных факторов, хорошо известных в области медицины.

Фармацевтическую композицию можно вводить с помощью любого приемлемого пути и метода. Приемлемые пути введения белка, варианта или антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, *in vivo* и *in vitro* хорошо

известны в данной области и их могут выбирать обычные специалистф в данной области.

В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, вводят парентерально.

5 В контексте настоящего описания фразы "парентеральное введение" и "введение парентерально" означают пути введения, отличные от энтерального и местного применения, как правило, путем инъекции, и включают эпидермальные, внутривенные, внутримышечные, внутриартериальные, подоболочечные, внутрикапсульные, внутриглазничные, внутрисердечные, 10 внутрисуставные, транстрахеальные, подкожные, субкутикулярные, внутрисуставные, субкапсульные, субарахноидальные, внутриспинальные, внутричерепные, внутригрудные, эпидуральные и интратернальные инъекции и инфузии.

В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, вводят путем 15 внутривенной или подкожной инъекции или инфузии.

Фармацевтические композиции, предназначенные для инъекции, как правило, должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композицию можно приготавливать в виде раствора, микроэмульсии, 20 липосомы или другой упорядоченной структуры, пригодной для включения лекарственного средства в высокой концентрации. Носитель может представлять собой водный или неводный растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их приемлемые смеси, 25 растительные масла, такие как оливковое масло и применяемые для инъекций органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и применения поверхностно-активных веществ. Во многих случаях 30 предпочтительно включать в композицию изотонирующие агенты, например, сахара, многоатомные спирты, такие как глицерин, маннит, сорбит или хлорид натрия. Пролонгированную абсорбцию инъекцируемых композиций можно обеспечивать путем включения в композицию агента, который задерживает

абсорбцию, например, солей моностеарата и желатина. Стерильные растворы для инъекций можно приготавливать путем введения действующего вещества в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним ингредиентом или при необходимости с их комбинацией, например, из числа перечисленных выше, с последующей стерилизацией микрофильтрацией. Как правило, дисперсии получают путем введения действующего вещества в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты, например, из числа перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций примерами методов приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), которые позволяют получать порошок действующего вещества плюс любого дополнительного требуемого ингредиента из его предварительно стерилизованного фильтрацией раствора.

Стерильные инъекционные растворы можно приготавливать путем включения действующего вещества в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним ингредиентом или их комбинацией, например, из числа перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией микрофильтрацией. Как правило, дисперсии получают путем включения действующего вещества в стерильный наполнитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты, например, из числа перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций примерами методов приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), которые позволяют получать порошок действующего вещества плюс любого дополнительного требуемого ингредиента из его предварительно стерилизованного фильтрацией раствора.

#### Терапевтические применения

Другим объектом настоящего изобретения является белок, например, антитело, или фармацевтическая композиция, предлагаемые в изобретении, указанные в любом из объектов или вариантов осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, для применения в качестве лекарственного средства.

Другим объектом настоящего изобретения является белок, например, антитело, или фармацевтическая композиция, предлагаемые в изобретении, указанные в любом из объектов или вариантов осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, для применения для лечения

5 заболелвания.

В следующем объекте изобретения указанное лечение заболелвания включает лечение рака, инфекционного заболелвания, воспалительного заболелвания или аутоиммунного заболелвания. Другим объектом настоящего изобретения является применение, в котором заболелвание представляет собой

10 рак. Должно быть очевидно, что наиболее предпочтительно такое применение включает применение для лечения людей.

Другим объектом настоящего изобретения является способ лечения, включающий введение белка, например, антитела, или фармацевтической композиции, предлагаемых в изобретении, указанных в любом из объектов или

15 вариантов осуществления изобретения, указанных в настоящем описании, человеку.

Другим объектом настоящего изобретения является способ лечения, включающий введение белка, например, антитела, или фармацевтической композиции, предлагаемых в изобретении, указанных в любом из объектов или

20 вариантов осуществления изобретения, указанных в настоящем описании, человеку, страдающему заболелванием. В другом объекте изобретения указанное заболелвание включает рак, инфекционное заболелвание, воспалительное заболелвание или аутоиммунное заболелвание. В другом объекте изобретения указанное заболелвание представляет собой рак.

Белок, вариант, антитело или фармацевтическую композицию, предлагаемые в изобретении, можно применять в качестве лечения, когда не требуются иммунные эффекторные функции Fc-области антитела IgG1-изотипа, присущие антителу дикого типа. Например, белок, вариант или антитело можно

25 вводить в клетки в культуре, например, *in vitro* или *ex vivo*, или человеку, например, *in vivo*, для лечения или предупреждения таких нарушений как рак, инфекционное заболелвание, воспалительные или аутоиммунные нарушения. В контексте настоящего описания понятие "субъект", как правило, относится к

30 человеку, который реагирует на белок, вариант, антитело или фармацевтическую

композицию. Субъекты могут включать, например, больных людей, имеющих нарушения, которые можно корректировать или облегчать путем модуляции целевой функции или путем обеспечения прямо или косвенно цитолиза клеток.

5 Другим объектом настоящего изобретения являются способы лечения или предупреждения нарушения, такого как рак, когда рекрутмент Т-клеток должен принимать участие в лечении или предупреждении, где способ включает введение в терапевтически эффективном количестве белка, варианта или антитела или фармацевтической композиции, предлагаемых в настоящем изобретении, субъекту, который нуждается в этом. Например, указанный белок, предлагаемый в изобретении, должен областью способностью привлекать цитотоксические Т-клетки, например, биспецифическое антитело, таргетирующее CD3 и раковый антиген. Клетки, сверхэкспрессирующие специфические для опухоли мишени, являются наиболее ценными мишенями для такого белка, варианта или антитела, предлагаемого в изобретении, поскольку рекрутмент Т-клеток посредством одной из двух связывающих областей белка, варианта или антитела может запускать цитотоксическую активность Т-клеток. Указанный механизм в норме трудно осуществлять, поскольку запуск цитотоксической активности может не работать надлежащим образом в отношении элиминации раковых клеток.

20 Согласно другому объекту изобретения белки, включая антитела и биспецифические антитела, предлагаемые в изобретении, например, указанные в настоящем описании, конъюгируют с другой молекулой. Указанный белок можно получать путем химической конъюгации другой молекулы с N-концевой областью или C-концевой областью белка или антитела, или его фрагмента (см., например, *Antibody Engineering Handbook*, под ред. Osamu Kanemitsu, публикация Chijin Shokan (1994)). Указанные конъюгированные производные антител при необходимости можно создавать также путем конъюгации на внутренних остатках или сахарах. Согласно предпочтительному объекту изобретения белки, включая антитела и биспецифические антитела, предлагаемые в изобретении, конъюгируют с терапевтической молекулой. Указанные терапевтические молекулы могут включать, например, нуклеиновые кислоты, такие как аптамер, рибозим, антисмысловая молекула или индуцирующие РНКi агенты. Другие терапевтические молекулы, которые можно

рассматривать, включают цитотоксин, химиотерапевтический агент, иммунодепрессант или радиоизотоп. Указанные конъюгаты можно обозначать как иммуноконъюгаты. Иммуноконъюгаты, которые включают один или несколько указанных токсинов, можно обозначать как иммунотоксины.

5           Терапевтические молекулы, которые можно применять для создания иммуноконъюгатов, предлагаемых в настоящем изобретении, могут включать таксол, цитохалазин В, грамицидин D, этидийбромид, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, 10 актиномицин D, глюкокортикоиды, новокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин, антиметаболиты (такие как метотрексат, 6- меркаптопурин, 6- тиогуанин, цитарабин, флударабин, 5-фторурацил, декарбазин, гидроксимочевина, аспарагиназа, гемцитабин, кладрибин), алкилирующие агенты (такие как мехлорэтамин, тиозпа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин 15 (BSNU), ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, диброманнит, стрептозотоцин, дакарбазин (DTIC), прокарбазин, митомицин С, цисплатин и другие производные платины, такие как карбоплатин), антибиотики (такие как дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, даунорубицин (ранее дауномицин), доксорубицин, идарубицин, митрамицин, митомицин, 20 митоксантрон, пликамицин, антрамицин (АМС)), дифтерийный токсин и родственные молекулы (такие как цепь А дифтерийного токсина и ее активные фрагменты и гибридные молекулы), токсин рицина (такой как рицин А или токсин с дегликозилированной цепью рицина А), холерный токсин, Шига- подобный токсин (SLT I, SLT II, SLT IV), LT-токсин, СЗ-токсин, Шига-токсин, 25 коклюшный токсин, столбнячный токсин, ингибитор протеазы Боумена-Бирка сои, экзотоксин *Pseudomonas*, алорин, сапорин, модецин, геланин, цепь А абрина, цепь А модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII и PAP S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaria officinalis*, гелонин, 30 митогеллин, рестриктоцин, феноменицин или эномициновые токсины.

Способ, как правило, включает ведение субъекту белка, варианта или антитела в количестве, эффективном для лечения или предупреждения нарушения.

Эффективные дозы и схемы дозирования белка, варианта или антитела зависят от заболевания или состояния, подлежащего лечению, и их могут определять специалисты в данной области.

5 Например, "эффективное количество" для терапевтического применения можно определять по его способности стабилизировать прогрессирование заболевания. Способность соединения ингибировать рак можно, оценивать, например, с помощью созданной на животных модельной системы, которая позволяет прогнозировать эффективность при опухолях человека.

10 Альтернативно этому, указанную способность композиции можно определять путем оценки способности белка, варианта или антитела ингибировать рост клеток или индуцировать цитотоксичность с помощью анализов *in vitro*, известных практикующим специалистам в данной области. Терапевтически эффективное количество терапевтического соединения, т.е. терапевтического белка, варианта, антитела или фармацевтической композиции, предлагаемых в

15 изобретении, может уменьшать размер опухолей или иным образом облегчать симптомы у субъекта.

В одном из вариантов осуществления изобретения белок, антитело или вариант можно вводить в качестве поддерживающей терапии, например, с регулярными интервалами в течение определенного периода или вплоть до

20 прогрессирования заболевания. Белок, антитело или вариант можно вводить также в качестве профилактики для снижения риска развития рака, отсрочивания наступления события, связанного с прогрессированием рака, и/или снижения риска рецидива, когда рак находится на стадии ремиссии.

Белок, антитело или вариант можно вводить также в качестве

25 профилактики для снижения риска развития рака, отсрочивания наступления события, связанного с прогрессированием рака, и/или снижения риска рецидива, когда рак находится на стадии ремиссии.

#### Диагностические применения

Неактивирующий белок, предлагаемый в изобретении, может оказаться

30 также ценным для диагностических целей при использовании композиции, которая содержит белок, указанный в настоящем описании. Таким образом, в изобретении предложены диагностические способы и композиции, в которых используют белки, указанные в настоящем описании. Такие способы и

композиции можно применять только для диагностических целей, таких как обнаружение или идентификация заболевания, а также для мониторинга хода терапевтического лечения, мониторинга прогрессирования заболевания, оценки состояния после лечения, мониторинга рецидива заболевания, оценки риска развития заболевания и т.п. При использовании указанного белка, предлагаемого в изобретении, можно, например, избегать любых нежелательных действий, обусловленных Fc-областью, которые могут препятствовать диагностическому применению.

В одном из объектов изобретения белок, предлагаемый в настоящем изобретении, применяют *ex vivo*, например, для диагностирования заболевания, при котором клетки экспрессируют указанную специфическую представляющую интерес мишень, с которой связывается белок, являются индикаторами заболевания или вовлечены в патогенез, путем определения уровней мишени или уровней клеток, которые экспрессируют представляющую интерес мишень на их клеточной поверхности, в образце, полученном из организма пациента. Для достижения этого можно, например, приводить в контакт образец, подлежащий тестированию, необязательно параллельно с контрольным образцом, с белком, предлагаемым в изобретении, в условиях, которые обеспечивают связывание белка с мишенью. Затем можно осуществлять обнаружение образовавшегося комплекса (например, с помощью ELISA). Когда контрольный образец применяют наряду с тестируемым образцом, то уровень белка или комплекса белок-мишень анализируют в обоих образцах, и статистически значимый более высокий уровень белка или комплекса белок-мишень в тестируемом образце свидетельствует о более высоком уровне мишени в тестируемом образце по сравнению с контрольным образцом.

Примеры общепринятых иммуноанализов, в которых можно использовать белки, предлагаемые в настоящем изобретении, включают (но не ограничиваясь только ими) анализы ELISA, РИА, FACS, анализы на основе плазмонного резонанса, хроматографические анализы, иммуногистохимию тканей, Вестерн-блоттинг и/или иммунопреципитацию.

Одним из вариантов осуществления изобретения является способ обнаружения присутствия мишени или клетки, экспрессирующей мишень, в образце, включающий:

- приведение в контакт образца с белком, предлагаемом в изобретении, в условиях, которые обеспечивают связывание белка с мишенью в образце; и

- анализ, позволяющий решить, произошло ли образование комплекса. Как правило, образец представляет собой биологический образец.

5 В одном из вариантов осуществления изобретения образец представляет собой образец ткани, для которой известно, что она содержит, или ожидается присутствие в ней специфической мишени и/или клеток, экспрессирующих мишень. Например, детекцию *in situ* экспрессии мишени можно осуществлять путем получения гистологического образца из организма пациента и приведения  
10 белка, предлагаемого в настоящем изобретении, в контакт с указанным образцом. Белок можно приводить в контакт путем нанесения белка на образец или покрытия белком образца, после чего можно осуществлять его обнаружение с использованием пригодных средств. Можно определять не только присутствие мишени или экспрессирующих мишень клеток, но также распределение мишени  
15 или экспрессирующих мишень клеток в исследуемой ткани (например, в контексте оценки распространения раковых клеток). При осуществлении настоящего изобретения, как должно быть очевидно обычным специалистам в данной области, любой из широкого спектра гистологических методов (таких как процедуры окрашивания) можно модифицировать для достижения указанной  
20 детекции *in situ*.

В описанных выше анализах белок можно метить с помощью поддающейся обнаружению субстанции, позволяющей обнаруживать связанный белок, подлежащий обнаружению. Альтернативно этому, связанный (основной) специфический белок можно обнаруживать с помощью антитела, меченного  
25 поддающейся обнаружению субстанцией, которая связывается с основным специфическим белком.

Уровень метки в образце можно оценивать также с помощью иммуноанализа в условиях конкуренции, используя стандарты мишени, меченные поддающейся обнаружению субстанцией, и немеченый специфический  
30 для мишени белок. В таком типе анализа биологический образец, меченый(ые) стандарт(ы) мишени и специфический для мишени белок объединяют и определяют количество меченого стандарта мишени, связанного с немеченым специфическом для мишени белком. Количество метки в биологическом образце

обратно пропорционально количеству меченого стандарта мишени, связанного со специфическим для мишени белком.

Метки, пригодные для специфического для мишени белка, вторичного антитела и/или стандарта мишени, применяемых в диагностических методах *in vitro*, включают (но не ограничиваясь только ими), различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы и радиоактивные материалы. Примеры пригодных ферментов включают пероксидазу из хрена, щелочную фосфатазу,  $\beta$ -галактозидазу и ацетилхолинэстеразу; примеры пригодных комплексов простетических групп включают стрептвидин/биотин и авидин/биотин; примеры пригодных флуоресцентных материалов включают умбеллиферон, флуоресцеин, изотиоцианат флуоресцеина, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеина, дансилхлорид и фикоэритрин; пример люминесцентного материала включает люминол; и примеры пригодных радиоактивных материалов включают  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  и  $^3\text{H}$ .

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предложен способ визуализации *in vivo*, в котором специфический для мишени белок, предлагаемый в настоящем изобретении, конъюгируют с рентгеноконтрастным агентом, способствующим обнаружению, конъюгированный белок вводят хозяину, например, путем инъекции в кровоток, и анализируют присутствие и местоположение меченого белка в организме хозяина. В настоящем изобретении предложен основанный на этой методике и любом другом методе диагностики, указанном в настоящем описании, способ скрининга в отношении связанных с заболеванием клеток у больного человека или в биологическом образце из организма больного человека, и/или оценки распределения специфического для мишени белка до применения специфической для мишени ADC-терапии.

Для диагностической визуализации радиоизотопы можно связывать со специфическим для мишеней белком либо непосредственно, либо косвенно с использованием промежуточной функциональной группы. Ценные промежуточные функциональные группы включают хелаторы, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота и диэтилентриаминпентауксусная кислота (см., например, US 5057313).

Диагностические методы можно осуществлять с использованием помимо радиоизотопов и рентгеноконтрастных агентов с использованием специфических для мишеней белков, конъюгированных с красителями (например, с комплексом биотин-стрептавидин), контрастными веществами, флуоресцентными соединениями или молекулами и усиливающими агентами (например, парамагнитными ионами) для магнитно-резонансной томографии (МРТ) (см., например, патент США № 6331175, в котором описаны методики МРТ и получения белков, конъюгированных с агентом, повышающим четкость МРТ-изображений). Указанные диагностические/предназначенные для детекции агенты можно выбирать из агентов, применяемых для МРТ, и флуоресцентных соединений. Таким образом, в настоящем изобретении предложен диагностический специфический для мишени белок, где специфический для мишени белок конъюгируют с контрастным веществом (например, предназначенным для магнитно-резонансной томографии, компьютерной томографии или в качестве контрастирующего агента для ультразвукового исследования) или радионуклидом, который может представлять собой, например, гамма-, бета-, альфа-, оже-электрон или позитрон-излучающий изотоп.

Следующим объектом изобретения является набор, предназначенный для обнаружения присутствия антигена-мишени или клетки, экспрессирующей мишень, в образце, содержащий:

- специфическое для мишени антитело, предлагаемое в изобретении; и
- инструкции по применению набора.

Одним из вариантов осуществления изобретения является предлагаемый в настоящем изобретении набор для диагностики рака, содержащий контейнер, включающий специфический для мишени белок и один или несколько реагентов, предназначенных для обнаружения связывания специфического для мишени белка с мишенью. Реагенты могут включать, например, флуоресцентные метки, ферментативные метки или другие поддающиеся обнаружению метки. Реагенты могут включать также вторичные или третичные антитела или реагенты для ферментативных реакций, когда в результате ферментативных реакций образуется продукт, который можно визуализировать. Одним из вариантов осуществления изобретения является предлагаемый в настоящем изобретении

5 диагностический набор, который содержит один или несколько специфических для мишени белков, предлагаемых в настоящем изобретении, в меченой или немеченой форме в приемлемом(ых) контейнере(ах), реагенты для инкубации в непрямом анализе и субстраты или дериватирующие агенты для обнаружения в таком анализе, в зависимости от природы метки. Могут быть включены также контролирующий(ие) реагент(ы) и инструкции по применению.

10 Диагностические наборы могут быть предназначены также для применения со специфическим для мишени белком, таким как специфический для мишени белок, предназначенный для обнаружения присутствия мишени в образце ткани или в хозяине. В таких диагностических наборах, а также в наборах для терапевтических применений, указанных в другом месте в настоящем описании, специфический для мишени белок, как правило, может находиться в контейнере в лиофилизированной форме либо индивидуально, либо в сочетании с 15 дополнительными антителами, специфическими для клетки-мишени или пептида. Как правило, включены также фармацевтически приемлемый носитель (например, инертный разбавитель) и/или такие компоненты, как Трис, фосфатный или карбонатный буфер, стабилизаторы, консерванты, биоциды, инертные белки, например, сывороточный альбумин или т.п. (как правило, в отдельном контейнере, предназначенном для смешивания) и дополнительные 20 реагенты (также, как правило, в отдельном(ых) контейнере(ах)). В некоторые наборы включено также вторичное антитело, обладающее способностью связываться со специфическим для мишени белком, которое, как правило, присутствует в отдельном контейнере. Вторичное антитело, как правило, конъюгировано с меткой, и приготовлено с использованием метода, 25 аналогичного методу, применяемому для специфического для мишени белка, предлагаемого в настоящем изобретении. С использованием методов, указанных выше и в других местах в настоящем описании, специфические для мишени белки можно применять для обнаружения субпопуляций раковых/опухолевых клеток и характеристики указанных клеток и соответствующих опухолевых 30 тканей.

Таблица 1

Перечень последовательностей

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
1	Шарнир, CH2- и CH3-участки человеческого IgG1 (аллотип G1m(f))	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
2	Шарнир, CH2- и CH3-участки человеческого IgG1 (аллотип G1m(f)) с заменами FER (жирный шрифт)	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
3	Шарнир, CH2- и CH3-участки человеческого IgG1 (аллотип G1m(f)) с заменами FEA (жирный шрифт)	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
4	CH1-участок человеческого IgG1 (аллотип G1m(f))	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV
5	CH1, шарнир, CH2- и CH3-участки человеческого IgG1 (аллотип G1m(f))	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
6	Константная область человеческой легкой каппа-цепи	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
7	Константная область человеческой легкой лямбда-цепи	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSQRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
8	Шарнир, CH2- и CH3-участки константной области человеческого IgG4	ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
9	Шарнир, CH2- и CH3-участки человеческого IgG1(аллотип G1m(f)) с заменой F405L (жирный шрифт)	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
10	Шарнир, CH2- и CH3-участки человеческого IgG1 (аллотип G1m(f)) с заменой K409R (жирный шрифт)	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS <b>R</b> LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
11	Шарнир, CH2- и CH3-участки человеческого IgG1 (аллотип G1m(f)) с заменами FER и с заменой F405L (жирный шрифт)	EPKSCDKTHTCPPCPAPE <b>FER</b> GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF <b>LL</b> YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
12	Шарнир, CH2- и CH3-участки человеческого IgG1 (аллотип G1m(f)) с заменами FER и с заменой K409R (жирный шрифт)	EPKSCDKTHTCPPCPAPE <b>FER</b> GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS <b>R</b> LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
13	Шарнир, CH2- и CH3-участки человеческого IgG1 (аллотип G1m(f)) с заменами FEA и с заменой F405L (жирный шрифт)	EPKSCDKTHTCPPCPAPE <b>FE</b> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV <b>V</b> AVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF <b>LL</b> YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	Шарнир, CH2- и CH3-участки человеческого IgG1 (аллотип G1m(f)) с заменами FEA и с заменой K409R (жирный шрифт)	EPKSCDKTHTCPPCPAPE <b>FE</b> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV <b>V</b> AVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS <b>R</b> LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	FCGR1AECD-HisBAP	MWFLTTLTLLWVPVDGQVDTTKAVITLQPPWVSVFQEETVTLHCEVLHLPSSSTQWFLNGTATQTSTPSYRITSASVNDSGEYRCQRGLSGRSDPIQLEIHRGWLLQVSSRVFTEGEPLALRCHAWKDKLVYNVLYYRNGKAFKFFHWNSNLTKLKNISHNGTYHCSGMGKHRYTSAGISVTVKELFPAPVLNASVTSPLLEGNLVTLSCETKLLLQRPGLQLYFSFYMGSKTLRGRNTSSEYQILTARREDSGLYWCEAATEDGNVLKRSPELELQVLGLQLPTPVWFHPGSSSHHHHHHPGGGLNDIFEAQKIEWHE
16	diFCGR2AH-HisBAP	METQMSQNVCPRNLLWLLQPLTVLLLLASADSQAAAPPKAVLKLLEPPWINVLQEDSVLTCQGARSPESDSIQWFHNGNLIPHTHTQPSYRFKANNNDSGEYTCQTGQTSLSDPVHLTVLSEWLVLQTPHLEFQEGETIMLRCHSWKDKPLVKVTFQNGKSKQFSLDPTFSIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTLFSSKPVTTITVQVPSMGSSSPVAPPKAVLKLEPPWINVLQEDSVLTCQGARSPESDSIQWFHNGNLIPHTHTQPSYRFKANNNDSGEYTCQTGQTSLSDPVHLTVLSEWLVLQTPHLEFQEGETIMLRCHSWKDKPLVKVTFQNGKSKQFSLDPTFSIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTLFSSKPVTTITVQVPSMGPGSSSHHHHHHPGGGLNDIFEAQKIEWHE

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
17	diFCGR2AR-HisBAP	MVLSLLYLLTALPGILSAAPPKAVLKLEPPWINVLQEDSVTLTC QGARSPESDSIQWFHNGNLIPTHTQPSYRFKANNNDSGEYTCQ TGQTSLSDPVHLTVLSEWLVLQTPHLEFQEGETIMLRCHSWKD KPLVKVTFQNGKSQKFSRLDPTFSIPQANSHSHSGDYHCTGNIG YTLFSSKPVTTITVQVPSMGSSSPAAPPKAVLKLEPPWINVLQED SVTLTCQGARSPESDSIQWFHNGNLIPTHTQPSYRFKANNND SGEYTCQTGQTSLSDPVHLTVLSEWLVLQTPHLEFQEGETIMLR CHSWKDKPLVKVTFQNGKSQKFSRLDPTFSIPQANSHSHSGDY HCTGNIGYTLFSSKPVTTITVQVPSMGSSSPGSSSHHHHHHPGG LNDIFEAQKIEWHE
18	diFCGR2B-HisBAP	MVLSLLYLLTALPGILSAAPPKAVLKLEPQWINVLQEDSVTLTC RGTHSPESDSIQWFHNGNLIPTHTQPSYRFKANNNDSGEYTCQ TGQTSLSDPVHLTVLSEWLVLQTPHLEFQEGETIVLRCHSWKD KPLVKVTFQNGKSKKFSRSDPNFSIPQANSHSHSGDYHCTGNI GYTLYSSKPVTTITVQAPSSSPMGAAPPKAVLKLEPQWINVLQ EDSVTLTCRGTHSPESDSIQWFHNGNLIPTHTQPSYRFKANN DSGEYTCQTGQTSLSDPVHLTVLSEWLVLQTPHLEFQEGETIV LRCHSWKDKPLVKVTFQNGKSKKFSRSDPNFSIPQANSHSHSGD YHCTGNIGYTLYSSKPVTTITVQAPSSSPMGPSSSHHHHHHPG GGLNDIFEAQKIEWHE
19	diFCGR3AF-HisBAP	MVLSLLYLLTALPGISTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLK CQGAYPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRC QTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWK NTALHKVTYLQNGKGRKYFHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRG LFGSKNVSSETVNITITQGPSMGSSSPSEDLPKAVVFLEPQWYR VLEKDSVTLKCQGAYPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAAT VDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLQAPRWVFKEED PIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHNSDFYIPKATL KDSGSYFCRGLFGSKNVSSETVNITITQGPSMGSSSPGPGSSSH HHHHHPGGGLNDIFEAQKIEWHE
20	diFCGR3AV-HisBAP	MVLSLLYLLTALPGISTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLK CQGAYPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRC QTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWK NTALHKVTYLQNGKGRKYFHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRG LVGSKNVSSETVNITITQGPSMGSSSPSEDLPKAVVFLEPQWYR VLEKDSVTLKCQGAYPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAAT VDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLQAPRWVFKEED PIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHNSDFYIPKATL KDSGSYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGPSMGSSSPGPGSSSH HHHHHPGGGLNDIFEAQKIEWHE
21	FcRnECDHisBAP	MGVPRPQPWALGILLFLLPGSLGAESHSLLYHLTAVSSPAPG TPAFWVSGWLGPPQYLSYNSLRGAEPCGAWVWENQVSWY WEKETDLRIKEKLFLEAFKALGGKGPYTLQGLLGCELGPDNT SVPTAKFALNGEEFMNFDLKQGTWGGDWPEALAISRWQQQ DKAANKELTFLFSCPHRLREHLERGRGNLEWKEPPSMRLKAR PSSPGFSVLTCSAFSFPPELQLRFLRNGLAAGTGQGDGPNSD GSFHASSSLTVKSGDEHHYCCIVQHAGLAQPLRVELESPAKSSP GSSSHHHHHHPGGGLNDIFEAQKIEWHE
22	B2M	MSRSVALAVLALLSLGLEAIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLN CYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLFSKDW SFYLLY TFTPTKDEYACRVNHVTL SQPKIVKWRDM

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
23	CH1, шарнир, CH2- и CH3-участки человеческого IgG1, аллотип G1m(fa)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
24	CH1, шарнир, CH2- и CH3-участки человеческого IgG1, аллотип G1m(za)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
25	CH1, шарнир, CH2- и CH3-участки человеческого IgG1, аллотип G1m(zax)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEGLHNHYTQKSLSLSPGK
26	CH1, шарнир, CH2- и CH3-участки человеческого IgG1, аллотип G1m(zav)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
27	CH1, шарнир, CH2- и CH3-участки человеческого IgG1, аллотип G1m(fa) с заменами FER (жирный шрифт)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <b>FER</b> GPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
28	CH1, шарнир, CH2- и CH3-участки человеческого IgG1, аллотип G1m(fa) с заменами FEA (жирный шрифт)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <b>FEA</b> GGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVV <b>A</b> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
29	CH1, шарнир, CH2- и CH3-участки человеческого IgG1, аллотип G1m(za) с заменами FER (жирный шрифт)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <b>FER</b> GPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
30	CH1, шарнир, CH2- и CH3-участки человеческого IgG1, аллотип G1m(za) с заменой FEA (жирный шрифт)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <b>FE</b> GGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVV <b>A</b> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
31	CH1, шарнир, CH2- и CH3-участки человеческого IgG1, аллотип G1m(zav) с заменами FER (жирный шрифт)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <b>FER</b> GPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNIFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
32	CH1, шарнир, CH2- и CH3-участки человеческого IgG1, аллотип G1m(zav) с заменой FEA (жирный шрифт)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <b>FE</b> GGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVV <b>A</b> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNIFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
33	CH1, шарнир, CH2- и CH3-участки человеческого IgG1, аллотип G1m(zax) с заменами FER (жирный шрифт)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <b>FER</b> GPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEGLHNHYTQKSLSLSPGK
34	CH1, шарнир, CH2- и CH3-участки человеческого IgG1, аллотип G1m(zax) с заменами FEA (жирный шрифт)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <b>FE</b> GGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVV <b>A</b> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEGLHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
35	СН1, шарнир, СН2- и СН3-участки человеческого IgG1, аллотип G1m(f) с делецией К447	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
36	СН1, шарнир, СН2- и СН3-участки человеческого IgG1, аллотип G1m(f) с делецией К447 и с заменами FER (жирный шрифт)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <b>FER</b> GPSVFLFPPKPK DTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
37	СН1, шарнир, СН2- и СН3-участки человеческого IgG1, аллотип G1m(f) с делецией К447 и с заменами FEA (жирный шрифт)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <b>FEA</b> GGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPPEVTCVVVA <b>V</b> SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
38	СН1, шарнир, СН2- и СН3-участки мышиногo IgG2a	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNS GSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHP ASSTKVDKKEIEPRGPTIKCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKD VLMISLSPMVTCVVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVLTAQTQT HREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKALPAPIE RTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPED IYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNW VERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
39	СН1, шарнир, СН2- и СН3-участки мышиногo IgG2a с заменами FER (жирный шрифт)	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNS GSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHP ASSTKVDKKEIEPRGPTIKCPPCKCPAPN <b>FER</b> GPSVFIFPPKIKD VLMISLSPMVTCVVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVLTAQTQT HREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKALPAPIE RTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPED IYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNW VERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
40	СН1, шарнир, СН2- и СН3-участки IgG3, аллотип IGHG3*01	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVN HKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP EPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
41	CH1, шарнир, CH2- и CH3-участки IgG3, аллотип IGHG3*04	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVN HKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQ FKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSP GK
42	CH1, шарнир, CH2- и CH3-участки IgG3, аллотип IGHG3*01 с заменами FER (жирный шрифт)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVN HKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP EPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPE <b>FER</b> GGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK
43	CH1, шарнир, CH2- и CH3-участки IgG3, аллотип IGHG3*01 с заменами FEA (жирный шрифт)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVN HKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP EPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPE <b>FEA</b> GGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVA <b>V</b> SHEDPEVQFKWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK
44	CH1, шарнир, CH2- и CH3-участки IgG3, аллотип IGHG3*04 с заменами FER (жирный шрифт)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVN HKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP APE <b>FER</b> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQ FKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSP GK
45	CH1, шарнир, CH2- и CH3-участки IgG3, аллотип IGHG3*04 с заменами FEA (жирный шрифт)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVN HKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP APE <b>FEA</b> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVA <b>V</b> SHEDPEVQ FKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSP GK
46	CH1, шарнир, CH2- и CH3-участки константной области человеческого IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG AL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVNDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
47	CH1, шарнир, CH2- и CH3-участки человеческого IgG4 с заменами L235E-G236R (жирный шрифт)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEF <b>ER</b> GPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK
48	CH1, шарнир, CH2- и CH3-участки человеческого IgG4 с заменами L235E-D265A (жирный шрифт)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEF <b>E</b> GGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVA <b>V</b> SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK
49	Константная область мышиной легкой каппа-цепи	RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPYKDKINVKWKID GSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLLTKDEYERHNSYT CEATHKTTSTSPIVKSFNRNEC

### Примеры

#### Введение

При применении инертного формата FEA (L234F-L235E-D265A) в антителе IgG1-изотипа, которое в качестве IgG1 дикого типа очень эффективно индуцирует опосредуемую компонентом цитотоксичность (CDC), CDC-активность значительно подавляется. Однако в исследовательских экспериментах установлено, что антитела IgG1-изотипа, несущие замены FEA, иногда все еще сохраняют небольшую остаточную CDC-активность, что может быть нежелательным, когда побочные действия или ограничивающая дозу токсичность рассматриваемого терапевтического антитела, могут в значительной степени зависеть от опосредуемых Fc эффекторных функций, таких как CDC.

Кроме того, при создании изобретения обнаружено также, что у антител, несущих инертный формат FEA, повышалась гетерогенность гликозилирования, а также повышался уровень галактозилирования и присутствия заряженных гликанов по сравнению с подобным форматом дикого типа. Изменения в профиле гликозилирования могут оказывать действие на эффективность и фармакокинетические свойства, и это необходимо отслеживать и контролировать при производстве. После оценки профиля гликанов антител, содержащих инертный формат FEA, при создании изобретения установлено, что повышенная гетерогенность гликозилирования, повышенные уровни

5 галактозилирования и повышенные уровни заряженных гликанов могут быть обусловлены заменой D265A. Принимая во внимание возможную остаточную активность CDC при применении FEA-формата и принимая во внимание профиль гликозилирования FEA, при создании изобретения предпринята попытка создать улучшенный формат.

10 С целью указанных улучшений предполагалось объединять замены L234F, L235E и G236R. Однако комбинация любых мутаций, не говоря уже о любом отборе специфических мутаций, по своей сути является непредсказуемой. Кроме того, объединение мутаций L234F, L235E и G236R, т.е. наличие нескольких модификаций, упакованных близко друг к другу, является непростой задачей, поскольку невозможно предсказать структурное и/или функциональное воздействие такого множества изменений. По этой причине при создании изобретения в пилотном эксперименте тестировали воздействие комбинации L234F, L235E и G236R (FER) на способность подавлять CDC, а также на 15 профиль гликозилирования антител. При создании изобретения неожиданно было установлено, что указанные предварительные эксперименты свидетельствуют о том, что способность подавлять CDC путем интродукции FER-мутаций значительно улучшалась по сравнению с применением индивидуальных замен и по сравнению с заменами FEA. Кроме того, оценка 20 профиля гликозилирования продемонстрировала, что новые антитела, несущие инертный FER-формат, имели профиль гликанов, аналогичный профилю соответствующих антител, подобных дикому типу. Таким образом, указанные предварительные эксперименты побудили авторов изобретения полностью проанализировать клиническую пригодность инертного формата FER, что 25 описано ниже в примерах. При создании изобретения неожиданно было установлено, что касательно всех протестированных характеристик установлены весьма выгодные свойства инертного формата FER по сравнению с инертным форматом FEA, а также по сравнению с другими инертными форматами. Это свидетельствует о том, что новый FER-формат является весьма ценным для 30 клинической разработки и клинического применения. Указанный неактивирующий формат, который можно применять также в контексте других антител, таких, например, как слитые белки, можно рассматривать как

обладающий большим преимуществом и лучший в своем классе неактивирующих форматов.

Пример 1: Получение и очистка вариантов антител и создание вариантов биспецифических антител

5 Конструкции для экспрессии антител

Для экспрессии антител с человеческими или гуманизированными связывающими доменами создавали конструкции антител, содержащие последовательности переменных доменов тяжелой (VH) цепи и переменных доменов легкой (VL) цепи путем синтеза генов *de novo* (система GeneArt Gene Synthesis; фирма ThermoFisher Scientific, Германия) и клонировали в экспрессионных векторах pcDNA3.3 (фирма ThermoFisher Scientific, США), которые содержали константную область тяжелой цепи человеческого IgG1 (т.е. CH1, шарнир, CH2- и CH3-участок) человеческого IgG1m(f)- аллотипа (обозначен также как IgG1 в разделе "Примеры" в настоящей заявке; SEQ ID NO: 10 5), или человеческого IgG1m(fa)-аллотипа (SEQ ID NO: 23), или человеческого IgG1m(za)-аллотипа (SEQ ID NO: 24), или человеческого IgG1m(zax)-аллотипа (SEQ ID NO: 25), или человеческого IgG1m(zav)-аллотипа (SEQ ID NO: 26), или человеческого IgG1m(f)-аллотипа с рекомбинантной делецией С-концевого лизина (обозначен также как IgG1-delK; SEQ ID NO: 35), или ее варианты; 20 константную область тяжелой цепи человеческого IgG4 (шарнир, CH2, CH3, SEQ ID NO: 8; CH1, шарнир, CH2, CH3, SEQ ID NO: 46) или ее вариант; константную область тяжелой цепи человеческого IgG3 IgG3 аллотипа IGHG3\*01 (SEQ ID NO: 40) или человеческого IgG3 аллотипа IGHG3\*04 (обозначен также в настоящем описании как IgG3rch2; SEQ ID NO: 41), или ее 25 варианты; константную область тяжелой цепи мышинового IgG2a (SEQ ID NO: 38) или ее вариант; или константную область человеческой легкой каппа-цепи (LC; SEQ ID NO: 6) или человеческой лямбда-LC (SEQ ID NO: 7), или мышиной каппа-LC (SEQ ID NO: 49), в зависимости от выбранных связывающих доменов. Требуемые для создания вариантов замены интродуцировали путем синтеза 30 генов, и они описаны ниже. Варианты антител к CD20, представленные в настоящей заявке, имеют последовательности VH и VL, имеющие происхождение из ранее описанного антитела к человеческому CD20 типа I (Engelberts и др., 2020). Варианты антител к HLA-DR, представленные в

настоящей заявке, имеют последовательности VH и VL, имеющие происхождение из ранее описанных антител HLA-DR IgG1-HLA-DR-4 (US 6894149 B2) и IgG1-HLA-DR-1D09C3 (US 7521047 B2). Антитела к CD3, указанные в настоящей заявке, а также их варианты имеют последовательности  
5 VH и VL, имеющие происхождение из ранее описанного антитела к CD3 (т.е., CD3-huCLB-T3/4: Labrijn и др., PNAS, 110(13), 26 марта 2013 г., сс. 5145-5150 и Engelberts и др., 2020). Варианты антител к HER2, указанные в настоящей заявке, содержат последовательности VH и VL, имеющие происхождение из IgG1-HER2-1014-169 (WO 2012/143524). Человеческое антитело IgG1-изотипа,  
10 содержащее VH/VL антитела b12, т.е. HIV1 gp120-специфического антитела, применяли в некоторых экспериментах в качестве отрицательного контроля (Barbas и др., J Mol Biol. 230(3), 5 апреля 1993 г., сс. 812-812).

#### Неактивирующие варианты антител

Константные области тяжелой цепи человеческого IgG1 (т.е. шарнир, CH2-  
15 и CH3-участок) или напоминающие дикий тип его варианты, несущие мутацию F405L (SEQ ID NO: 9) или мутацию K409R (SEQ ID NO: 10), применяли в качестве контрольных антител соответственно. В некоторых примерах в качестве контролей применяли варианты антитела дикого типа с константными областями IgG4 (SEQ ID NO: 8) или варианты IgG4, несущие мутацию S228P в  
20 SEQ ID NO:8.

Неактивирующий Fc-домен препятствует взаимодействию антител с Fc-рецепторами, которые присутствуют на иммунных клетках, или взаимодействию с C1q, активирующему классический путь комплемента. Как указано в представленных ниже примерах, создавали несколько вариантов  
25 неактивирующих антител и тестировали их в отношении способности подавлять Fc-функцию. В некоторых примерах группу неактивирующих вариантов антител тестировали в отношении фармакокинетических свойств, иммуногенности или возможности их совершенствования.

Создавали различные неактивирующие варианты антител с различными  
30 указанными и описанными выше последовательностями VH и VL. Следующие замены, в которых аминокислоты обозначены согласно Eи-нумерации, интродуцировали в HC-область IgG1m(f), имеющую SEQ ID NO: 1, также в комбинации с любой из мутаций F405L или K409R, что позволяло получать

биспецифические неактивирующие варианты антител: L234F-L235E-D265A (см. в том числе в US 10590206B2) только с указанными мутациями (SEQ ID NO: 3) или в комбинации с любой из мутаций F405L (SEQ ID NO: 13) или K409R (SEQ ID NO: 14), только с мутациями L234F-L235E-G236R (SEQ ID NO: 2) или в комбинации с любой из мутаций F405L (SEQ ID NO: 11) или K409R (SEQ ID NO: 12), только с мутациями L234A-L235A-P329G (Schlothauer и др., Protein Eng. Design and Selection) или в комбинации с любой из мутаций F405L или K409R, G236R-L328R (US 2006/0235208 A1, Moore и др., 2011, MAbs) в комбинации с любой из мутаций F405L или K409R, E233P-L234V-L235A-delG236-S267K (Moore at al., 2019, Methods) в комбинации с любой из мутаций F405L или K409R, N297G (Тao и Morrison, 1989, JI) в комбинации с любой из мутаций F405L или K409R, и L234A-L235E-G237A-A330S-P331S (US 8613926k) в комбинации с любой из мутаций F405L или K409R. В HC-область IgG1m(f) с рекомбинантной делецией C-концевого лизина HC (обозначен также как IgG1-delK), имеющую SEQ ID NO: 35, интродуцировали следующие мутации: L234F-L235E-G236R (SEQ ID NO: 36) и L234F-L235E-D265A (SEQ ID NO: 37). В HC-область IgG1m(fa), имеющую SEQ ID NO: 23, интродуцировали следующие мутации: L234F-L235E-G236R (SEQ ID NO: 27) и L234F-L235E-D265A (SEQ ID NO: 28). В HC-область IgG1m(za), имеющую SEQ ID NO: 24, интродуцировали следующие мутации: L234F-L235E-G236R (SEQ ID NO: 29) и L234F-L235E-D265A (SEQ ID NO: 30). В HC-область IgG1m(zax), имеющую SEQ ID NO: 25, интродуцировали следующие мутации: L234F-L235E-G236R (SEQ ID NO: 33) и L234F-L235E-D265A (SEQ ID NO: 34). В HC-область IgG1m(zav), имеющую SEQ ID NO: 26, интродуцировали следующие мутации: L234F-L235E-G236R (SEQ ID NO: 31) и L234F-L235E-D265A (SEQ ID NO: 32). В HC-область IgG3 (IGHG3\*01), имеющую SEQ ID NO: 40, интродуцировали следующие мутации: L234F-L235E-G236R (SEQ ID NO: 42) и L234F-L235E-D265A (SEQ ID NO: 43). В HC-область IgG3 (IGHG3\*04; который обозначен также как IgG3rch2), имеющую SEQ ID NO: 41, интродуцировали следующие мутации: L234F-L235E-G236R (SEQ ID NO: 44) и L234F-L235E-D265A (SEQ ID NO: 45). В HC-область IgG4, имеющую SEQ ID NO: 8, интродуцировали только следующие мутации или в комбинации с мутациями F405L-R409K с получением биспецифических инактивирующих вариантов антител: S228P-E233P-F234V-L235A-delG236 (WO

2015/143079) или в комбинации с F405L-R409K, S228P-F234A-L235A (Allegre и др., Transplantation, 57(11), 15 июня 1994 г., сс. 1537-1543 и Angal и др., Mol Immunol, 30(1), январь 1993 г., сс. 105-108), или в комбинации с F405L-R409K, L235E-G236R (SEQ ID NO: 47) и L235E-D265A (SEQ ID NO: 48). В HC-область  
5 мышинового IgG2a, имеющую SEQ ID NO: 38, интродуцировали следующие мутации: L234F-L235E-G236R (SEQ ID NO: 39), L234A-L235A (Arduin и др., Mol Immunol, 63(2), февраль 2005 г., сс. 456-463) и L234A-L235A-P329G (Lo и др., J Biol Chem, 292(9), 3 марта 2017 г., сс. 3900-3908).

#### Кратковременная экспрессия

10 Антитела экспрессировали в виде человеческих IgG1κ, IgG1λ, IgG3κ, IgG4κ или мышинового IgG2ак. Смесь плазмидных ДНК, которые кодируют и тяжелые, и легкие цепи антител, кратковременно трансфектировали клетки Expi293F™ (фирма Thermo Fisher Scientific, каталожный № A14527), используя ExpiFectamine™ (фирма Thermo Fisher Scientific, каталожный № A14525),  
15 согласно инструкциям производителя. В целом, метод состоял в следующем: обе ДНК (соотношение HC/LC 1:1) и ExpiFectamine разводили по отдельности в среде Opti-MEM I (фирма Thermo Fisher Scientific, каталожный № 51985034) до достижения концентрации 20 мкг/мл и 5,4 об.% соответственно. Оба раствора инкубировали в течение 5 мин, перемешивали и инкубировали в течение 10-20  
20 мин перед добавлением к  $3 \times 10^6$  Expi293F-клеток/мл в свежей среде Opti-MEM, дополненной pen/strep (конечная концентрация ДНК 1 мкг/мл). Приблизительно через 16-24 ч после трансфекции добавляли усилитель трансфекции ExpiFectamine 293 I (0,5 об.%) и II (5 об.%). Как правило, супернатант собирали через 5 дней после трансфекции. Концентрации антител в супернатантах  
25 определяли по абсорбции при 280 нм. Антитела очищали согласно описанному ниже методу.

#### Очистка и оценка качества антител

Антитела очищали с помощью аффинной хроматографии на белке А. Супернатанты культур фильтровали через тупиковый фильтр с размером пор  
30 0,20 мкм и вносили на 5-миллилитровые колонки MabSelect SuRe (фирма GE Healthcare/Cytiva), промывали с помощью буфера, содержащего 0,02М цитрат натрия-NaOH, pH 5,0 и элюировали с помощью буфера, содержащего 0,02М цитрат натрия-NaOH, pH 3. Элюаты подвергали диализу в противотоке ЗФР

(буфер, содержащий 8,65мМ безводный  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,9мМ моногидрат  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 140,3мМ  $\text{NaCl}$ , pH 7,4, приготовленный для фирмы GenTab на фирме HyClone/Cytiva). При необходимости, белки дополнительно очищали с помощью препаративной гель-фильтрации (SEC) для удаления агрегатов. После замена  
5 буфера или осуществления SEC образцы стерилизовали фильтрацией через тупиковые фильтры с размером пор 0,2 мкм. Качество очищенных белков анализировали с помощью масс-спектрометрии, капиллярного электрофореза (КЭ-ДСН в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях) и высокоэффективной гель-фильтрации (HP-SEC). Концентрацию измеряли по  
10 абсорбции при 280 нм. Очищенные антитела хранили при 2-8°C.

#### Создание биспецифических антител

Биспецифическое антитело IgG1-изотипа создавали с помощью контролируемого обмена плечей (сFAE) между моноспецифическим антителом, несущим мутацию F405L в СН3-домене, и моноспецифическим антителом,  
15 несущим мутацию K409R в СН3-домене, в дополнение к перечисленным выше неактивирующим мутациям, в основном описанным ранее (Labrijn и др., Nature Protocols 9(10), октябрь 2014 г., сс. 245024-245063). Для получения биспецифических вариантов IgG4 использовали моноспецифическое антитело, несущее присутствующий в естественных условиях аргинин (R) в положении  
20 409, и другое моноспецифическое антитело, несущее мутации F405L-R409K в СН3-домене антитела. В целом, метод состоял в следующем: оба моноспецифических антитела смешивали в эквимольной концентрации и инкубировали с 75мМ 2-меркаптоэтиламино-НСl (2-МЕА) при 31°C в течение 5 ч. Затем 2-МЕА удаляли путем замены буфера на ЗФР с использованием кассет  
25 для диализа Slide-A-Lyzer (10K MWCO; фирма ThermoFisher Scientific) в течение ночи при 4°C. Буфер для диализа заменяли дважды. Созданные биспецифические антитела собирали из кассет и концентрацию измеряли по абсорбции при 280 нм. Очищенные биспецифические антитела хранили при 2-8°C и, как правило, анализировали с помощью КЭ-ДСН и HP-SEC для определения мономерного  
30 состояния созданных биспецифических антител и с помощью масс-спектрометрического анализа с использованием масс-спектрометра Orbitrap Q-Exactive Plus (фирма ThermoFisher Scientific) для определения эффективности сFAE и содержания биспецифического антитела.

### Создание F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов

F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты, которых является HLA-DR, создавали с помощью набора FragIT (фирма Genovis AB) практически согласно рекомендациям производителя. В целом, метод состоял в следующем: вращающиеся колонки с FragIT, смолой с ферментом FabRICATOR, который расщепляет IgG в специфическом сайте до шарнирной области с образованием гомогенного пула F(ab')<sub>2</sub>- и Fc/2-фрагментов, сшитой с агарозными гранулами, уравнивали с помощью буфера для расщепления (фирма Genovis AB). Затем на колонку вносили вариант антитела к человеческому HLA-DR IgG1-HLA-DR-1D09C3 с мутацией E430G и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре (КТ). После инкубации образцы элюировали и собирали из колонок. Очищенные F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты анализировали с помощью капиллярного электрофореза на полиакриламидных гелях с додецисульфатом натрия (КЭ-ДСН). Концентрацию измеряли по абсорбции при 280 нм. Очищенные антитела хранили при 2-8°C.

### Пример 2: Связывание с мишенью антител к человеческому CD20 и их неактивирующих вариантов на клетках Raji

Оценивали связывание с мишенью антитела к человеческому CD20 IgG1-изотипа, содержащего Fc-область дикого типа и ее варианты, несущие K409R, L234F-L235E-D265A-K409R, L234F-L235E-G236R-K409R, L234A-L235A-P329G-K409R, G236R-L328R-K409R, E233P-L234V-L235A-G236del-S267K-K409R, N297G-K409R, L234A-L235E-G237A-A330S-P331S-K409R, антитела IgG4-изотипа, содержащего Fc-область дикого типа и ее варианты, несущие S228P, S228P-F234A-L235A или S228P-E233P-F234V-L235A-G236del, с использованием клеток Raji, экспрессирующих CD20. Антитело дикого типа к HIV1 gp120 IgG1-изотипа (IgG1-b12) применяли в качестве несвязывающегося контроля.

Для этой цели клетки Raji ( $3 \times 10^4$  клеток, каталожный № CCL-86, ATCC) в FACS-буфере ( $1 \times 3$ ФР, каталожный № BE17-517Q, фирма Lonza; 0,1% бычьего сывороточного альбумина, BSA, каталожный № 10735086001, фирма Merck; 0,02% NaN<sub>3</sub>, каталожный № 41920044-3, фирма Bio-world) инкубировали в круглодонных 96-луночных планшетах из полистирола (каталожный № 650180, фирма Greiner bio-one) с сериями концентраций очищенных антител, мишенью которых является CD20 (конечные концентрации 0,0013-20 мкг/мл; 5-кратные разведения), в общем объеме 50 мкл в течение 30 мин при 4°C. Затем клетки

промывали дважды, добавляя 150 мкл FACS-буфера, с последующим пеллетированием клеток путем центрифугирования и удаляли супернатант. Связанные антитела окрашивали, добавляя 50 мкл козьего античеловеческого F(ab')<sub>2</sub> каппа, конъюгированного с PE (конечная концентрация 2,5 мкг/мл, каталожный № 2062-09, фирма Southern Biotech), в течение 30 мин при 4°C. Затем клетки промывали дважды путем добавления 150 мкл FACS-буфера с последующим пеллетированием клеток путем центрифугирования и удаляли супернатант. Связывание вариантов антител с человеческим CD20 выявляли с помощью проточной цитометрии с использованием устройства Intellicyt iQue screener (фирма Sartorius), путем измерения медианной интенсивности флуоресценции. Данные анализировали с использованием нелинейной модели зависимости ответа от дозы агониста с помощью пакета программ GraphPad PRISM (версия 8.4.1, фирма GraphPad Software). Данные представляют собой средние значения ± SEM, полученные в четырех независимых экспериментах.

Оценка связывания с мишенью вариантов антител к человеческому CD20 IgG1- и IgG4-изотипа продемонстрировала сходное связывание с мишенью всех вариантов антитела к человеческому CD20 IgG1-изотипа, несущих мутации в константной области тяжелой цепи (фиг. 1 А-Б). Для всех вариантов антител к человеческому CD20 IgG4-изотипа, включая те, которые содержали неактивирующие мутации S228P-F234A-L235A или S228P-E233P-F234V-L235A-G236del в константной области тяжелой цепи, обнаружено некоторое снижение связывания с мишенью по сравнению с вариантами антител IgG1-изотипа.

В целом, интродукция неактивирующих мутаций в тяжелую цепь антител к человеческому CD20 IgG1- и IgG4-изотипа не влияла на их способность связываться с их мишенью CD20.

Пример 3: Комплементзависимая цитотоксичность, обусловленная антителами к человеческому CD20 и их неактивирующими вариантами

Для терапевтических моноклональных антител, терапевтическое действие которых не зависит от взаимодействия с эффекторными молекулами иммунной системы (такими как белок системы комплемента C1q и Fcγ-рецепторы), а побочные действия или ограничивающая дозу токсичность в большой степени зависят от такого взаимодействия, неактивирующий Fc-домен можно рассматривать в качестве средства увеличения терапевтического окна. Контакт

антитела с белком C1q инициирует классический путь комплемента, который приводит к комплементзависимой цитотоксичности (CDC). Поэтому способность индуцировать CDC оценивали для антител к человеческому CD20 типа I, отобранных на основе их эффективной и сильной индукции CDC (Glennie и др., 5 Mol Immunology, 44(16), сентябрь 2007 г., сс. 3823-3837), а также для вариантов указанных антител, несущих неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи.

Антитела к человеческому CD20 IgG1-изотипа, либо дикого типа, либо несущие мутацию K409R, или их неактивирующие варианты, несущие мутации 10 L234F-L235E-D265A-K409R, L234F-L235E-G236R-K409R, L234A-L235A-P329G-K409R, G236R-L328R-K409R, E233P-L234V-L235A-G236del-S267K-K409R, N297G-K409R, L234A-L235E-G237A-A330S-P331S-K409R, а также антитела к человеческому CD20 IgG4-изотипа, либо дикого типа, либо несущие мутацию S228P, и их неактивирующие варианты, несущие мутации S228P-F234A-L235A 15 или S228P-E233P-F234V-L235A-G236del, тестировали в диапазоне концентраций (конечные концентрации 0,0024-10 мкг/мл; 4-кратные разведения) с использованием *in vitro* CDC-анализа на клетках Raji с 20%-ной нормальной человеческой сывороткой (NHS, каталожный № M0008, фирма Sanquin) в качестве источника комплемента. Клетки Raji ( $3 \times 10^4$  клеток на лунку) в среде 20 RPMI-1640 (каталожный № BE12-115F, фирма Lonza), содержащей 0,1% (мас./об.) бычьего сывороточного альбумина (BSA, каталожный № 10735086001, фирма Merck) и пенициллин-стрептомицин (Pen/Strep, конечная концентрация 50 ед./мл калиевого пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина сульфата, каталожный № DE17-603E, фирма Lonza), инкубировали в круглодонных 96-луночных 25 планшетах из полистирола (каталожный № 650180, фирма Greiner bio-one) с сериями концентраций очищенных антител, мишенью которых является CD20, в общем объеме 80 мкл в течение 15 мин при комнатной температуре (КТ). Затем добавляли 20 мкл NHS (конечная концентрация 20 об.%) и клетки инкубировали при 37°C в течение 45 мин. Реакцию прекращали, помещая планшеты на лед, 30 после чего пеллетировали клетки путем центрифугирования и заменяли супернатант на 30 мкл (2 мкг/мл) йодида пропидия (PI, каталожный № P4170, фирма Sigma Aldrich) в ЗФР (каталожный № SH3A3830.03, фирма GE Healthcare). Количество PI-позитивных клеток определяли проточной

цитометрией с использованием устройства Intellicyt iQue screener (фирма Sartorius). Процент PI-позитивных клеток, который соответствует проценту лизированных клеток, рассчитывали как: (количество PI-позитивных клеток / общее количество клеток)  $\times$  100%. Данные анализировали с использованием нелинейной модели зависимости ответа от дозы агониста, и для каждой экспериментальной повторности рассчитывали площадь под кривой (AUC), построенной с использованием преобразованных в log концентраций, с помощью GraphPad PRISM (версия 8.4.1, фирма GraphPad Software) с использованием в качестве исходного уровня данных, полученных для контроля без антитела, с последующей стандартизацией каждой экспериментальной повторности относительно значения AUC, измеренного для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%), и значения AUC, измеренного для варианта антитела дикого типа IgG1-изотипа (IgG1 в человеческому CD20, 100%). Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM, полученные в трех независимых экспериментах.

Оценка способности инициировать CDC вариантов антител к человеческому CD20 IgG1- и IgG4-изотипа показала, что способность элиминировать CDC путем интродукции неактивирующих мутаций в константную области тяжелой цепи их можно разделять на две группы. У вариантов антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа, несущих неактивирующие мутации L234F-L235E-G236R, L234A-L235A-P329G, G236R-L328R, E233P-L234V-L235A-G236del-S267K, N297G и L234A-L235E-G237A-A330S-P331S в дополнение к мутации K409R, а также у вариантов антител IgG4-изотипа, несущих неактивирующие мутации S228P-F234A-L235A или S228P-E233P-F234V-L235A-G236del, способность индуцировать CDC элиминировалась. Однако по сравнению с IgG1 дикого типа обнаружена остаточная CDC при применении варианта антитела к человеческому CD20 IgG1-изотипа, несущего мутации L234F-L235E-D265A-K409R (фиг. 2).

Таким образом, установлено, что у антитела IgG1-изотипа с новым вариантом мутаций L234F-L235E-G236R и мутацией K409R практически полностью отсутствует способность активировать классический путь комплемента. Аналогичное действие обнаружено для антитела, которое имеет только новые мутации L234F-L235E-G236R и не имеет мутацию K409. Это

является значительным преимуществом по сравнению, например, с вариантом антитела IgG1-изотипа, несущим мутации L234F-L235E-D265A и K409R, для которого обнаружена остаточная CDC.

Пример 4: Оценка связывания C1q с антителами к человеческому CD20 и их неактивирующими вариантами

В примере 3 продемонстрировано, что способность индуцировать CDC значительно снижалась у вариантов антител к человеческому CD20 IgG1- и IgG4-изотипа, несущих мутации, которые подавляют опосредуемые Fc эффекторные функции. В настоящем исследовании связывание белка комплемента C1q с вариантами антитела к человеческому CD20 IgG1-изотипа, несущими неактивирующими мутации в константной области тяжелой цепи, оценивали с использованием клеток Raji, экспрессирующих CD20.

Применяли анализ C1q-связывания на клетках Raji при использовании 20%-ной нормальной человеческой сыворотки (NHS, M0008, фирма Sanquin) в качестве источника C1q, и тестировали антитела к человеческому CD20 и их неактивирующие варианты в диапазоне концентраций (конечные концентрации 0,014-10 мкг/мл; 3-кратные разведения). Клетки Raji ( $1 \times 10^5$  клеток на лунку) в среде RPMI-1640 (каталожный № BE12-115F, фирма Lonza), содержащей 0,1% (мас./об.) бычьего сывороточного альбумина (BSA, каталожный № 10735086001, фирма Merck) и пенициллин-стрептомицин (Pen/Strep, конечная концентрация 50 ед./мл калиевого пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина сульфата, каталожный № DE17-603E, фирма Lonza), инкубировали в круглодонных 96-луночных планшетах из полистирола (каталожный № 650180, фирма Greiner bio-one) с сериями концентраций очищенных антител, мишенью которых является CD20, в общем объеме 80 мкл в течение 15 мин при 37°C. Для предупреждения активации CDC при добавлении NHS клетки охлаждали, помещая планшеты на лед. Затем добавляли 20 мкл NHS (конечная концентрация 20 об.%) и клетки инкубировали при 4°C в течение 45 мин, затем клетки пеллетировали центрифугированием и удаляли супернатант. Затем клетки промывали дважды путем добавления 150 мкл FACS-буфера ( $1 \times 3\text{ФР}$ , каталожный № BE17-517Q, фирма Lonza; 0,1% бычьего сывороточного альбумина, BSA; 0,02%  $\text{NaN}_3$ , каталожный № 41920044-3, фирма Bio-world), после чего пеллетировали клетки центрифугированием и удаляли супернатант. Связанный C1q окрашивали путем

добавления 50 мкл поликлонального кроличьего антитела к человеческому C1q, конъюгированного с FITC (конечная концентрация 20 мкг/мл, Дако, каталожный № F0254, фирма Agilent Technologies) в течение 30 мин при 4°C. Затем клетки промывали дважды путем добавления 150 мкл FACS-буфера, после чего пеллетировали клетки центрифугированием и удаляли супернатант. Связывание C1q с вариантами антител оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием устройства Intellicyt iQue screener (фирма Sartorius) путем измерения медианной интенсивности флуоресценции. Данные анализировали с использованием нелинейной модели зависимости ответа от дозы агониста с помощью пакета программ GraphPad PRISM (версия 8.4.1, фирма GraphPad Software). Данные представляют собой средние значения ( $\pm$  SD), полученные по трем измерениям в одном эксперименте.

Оценка связывания C1q с вариантами IgG1 к человеческому CD20 показала, что IgG1 к человеческому CD20 с мутацией K409R эффективно привлекал белок комплемента C1q после связывания с CD20 на клетках-мишенях Raji, в то время как антитело к HIV1 gp120 (IgG1-b12; несвязывающий CD20 контроль) не привлекало C1q. Интродукция любой из неактивирующих мутаций L234F-L235E-G236R или L234F-L235E-D265A резко снижала связывание с C1q (фиг. 3). Связывание с C1q сильнее снижалось у варианта IgG1 к человеческому CD20, несущего мутации L234F-L235E-G236R, по сравнению с вариантом IgG1 к человеческому CD20, несущим мутации L234F-L235E-D265A. Это согласуется с воздействием на активацию CDC указанных неактивирующих мутаций, описанных в примере 3.

Таким образом, установлено, что неактивирующий вариант IgG1 к человеческому CD20, несущий неактивирующие мутации L234F-L235E-G236R, сильно снижал C1q- связывание, что согласуется с обнаруженным снижением CDC.

Пример 5: Комплементзависимая цитотоксичность, индуцированная антителами к человеческому HLA-DR и их неактивирующими вариантами

В примере 3 активацию классического пути комплемента вариантами антител к человеческому CD20, несущими неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, оценивали с помощью *in vitro* CDC-анализа. Данные, представленные в примере 3, продемонстрировали, что вариант IgG1 к

человеческому CD20, несущий новые мутации L234F-L235E-G236R и K409R, предупреждал активацию классического пути комплемента. В настоящем примере представлены результаты дополнительной оценки способности активировать CDC неактивирующими вариантами антител, с использованием двух антител, таргетирующих человеческий HLA-DR, которые являются эффективными индукторами CDC при применении в IgG1-каркасе.

CDC-анализ *in vitro* осуществляли практически в соответствии с описанным в примере 3, на клетках Raji с использованием в качестве источника комплемента 20% NHS. В целом, метод состоял в следующем: антитела к человеческому HLA-DR IgG1-HLA-DR-4 и IgG1-HLA-DR-1D09C3, несущие мутацию в K409R, или их варианты, несущие неактивирующие мутации L234F-L235E-D265A или L234F-L235E-G236R в комбинации с K409R в константной области тяжелой цепи, а также таргетирующий HLA-DR F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент тестировали в диапазоне концентраций (конечные концентрации 0,014-10 мкг/мл; 3-кратные разведения). Количество PI-позитивных клеток, в качестве показателя лизиса клеток, определяли проточной цитометрией с использованием устройства Intellicyt iQue screener (фирма Sartorius). Данные анализировали с использованием нелинейной модели зависимости ответа от дозы агониста, и для каждой экспериментальной повторности рассчитывали площадь под кривой (AUC), построенной с использованием преобразованных в log концентраций, с помощью GraphPad PRISM (версия 8.4.1, фирма GraphPad Software) с использованием в качестве исходного уровня контроль без антитела, с последующей стандартизацией каждой экспериментальной повторности относительно значения AUC, измеренного для варианта антитела дикого типа IgG1-изотипа (100%). Данные получены по пяти (дикий тип и варианты L234F-L235E-D265A-K409R) или двух (варианты L234F-L235E-G236R-K409R или F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент) независимым экспериментам.

Оценка способности индуцировать CDC вариантов антител к человеческому HLA-DR показала, что варианты антител, несущие мутации L234F-L235E-D265A в дополнение к мутации K409R, сохраняли способность индуцировать CDC в отношении клеток Raji (фиг. 4А, Б). Однако интродукция неактивирующих мутаций L234F-L235E-G236R в варианты антител IgG1-HLA-DR-4-K409R и IgG1-HLA-DR-1D09C3-K409R резко снижала эффективность

индукции CDC. Кроме того, как установлено для IgG1-HLA-DR-1D09C3, эффективность индукции CDC вариантом антитела L234F-L235E-G236R-K409R находилась на таком же уровне, что и эффективность CDC, индуцированной таргетирующим HLA-DR F(ab')<sub>2</sub>-фрагментом, в котором отсутствует Fc-область и который вследствие этого не взаимодействует с белком комплемента C1q (фиг. 4Б).

Таким образом, варианты антител, несущие мутации L234F-L235E-G236R, эффективно снижали CDC до уровней, сходных с уровнем CDC, индуцированным F(ab')<sub>2</sub>-фрагментом, который не взаимодействует с системой комплемента человека.

Пример 6: Связывание с Fcγ-рецепторами антител к человеческому CD20 и их неактивирующих вариантов

Известно, что для терапевтических моноклональных антител, терапевтическое действие которых не зависит от взаимодействия с эффекторными молекулами иммунной системы (такими как белок системы комплемента C1q и Fcγ-рецепторы), а побочные действия или ограничивающая доза токсичность в большой степени зависят от такого взаимодействия, неактивирующий Fc-домен можно рассматривать в качестве средства увеличения терапевтического окна. Представленные в примерах 3-5 данные продемонстрировали, что интродукция неактивирующих мутаций в константную область тяжелой цепи антитела снижала его способность взаимодействовать с белком комплемента C1q и снижала индукцию CDC. В настоящем исследовании оценивали связывание антител к человеческому CD20 IgG1- или IgG4-изотипа и вариантов антител, несущих неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, с мономерным внеклеточным доменом (ECD) человеческого FcγRIa (SEQ ID NO:15) или димерными ECD человеческого FcγRIIa аллотипа 131H (SEQ ID NO:16), человеческого FcγRIIa аллотипа 131R (SEQ ID NO:17), человеческого FcγRIIb (SEQ ID NO:18), человеческого FcγRIIIa аллотипа 158F (SEQ ID NO:19) и человеческого FcγRIIIa аллотипа 158V (SEQ ID NO:20) с помощью ELISA-анализов.

Для этой цели тестировали антитело к человеческому CD20 дикого типа IgG1-изотипа, IgG1-K409R, его неактивирующие варианты, несущие мутации L234F-L235E-D265A-K409R, L234F-L235E-G236R-K409R, L234A-L235A-P329G-

K409R, G236R-L328R-K409R, E233P-L234V-L235A-G236del-S267K-K409R, N297G-K409R, L234A-L235E-G237A-A330S-P331S-K409R, а также IgG4 дикого типа, IgG4-S228P, и его неактивирующие варианты, несущие мутации S228P-F234A-L235A или S228P-E233P-F234V-L235A-G236del, в диапазоне

5 концентраций (0,0013-20 мкг/мл, полученные с помощью стадий пятикратных разведений), в отношении связывания с человеческими Fc $\gamma$ -рецепторами. Для оценки связывания с мономерными и димерными вариантами Fc $\gamma$ R 96-луночные

10 планшеты для ELISA типа Microton (фирма Greiner, Германия) сенсibilizировали в течение ночи при 4°C применяемым в концентрации 1 мкг/мл козьим F(ab')<sub>2</sub> к человеческому IgG-F(ab')<sub>2</sub> (фирма Jackson Laboratory, каталожный № 109-006-097) в ЗФР, а затем промывали и блокировали, используя

15 200 мкл/лунку ЗФР, дополненного 0,2% BSA (ЗФР/0,2% BSA), в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ). Осуществляя промывки между инкубациями (ЗФР, дополненный 0,05% Твин 20 (каталожный № P1379, Sigma); ЗФРТ; плюс 0,2% BSA; ЗФРТ/0,2% BSA), планшеты инкубировали при встряхивании, используя

20 100 мкл/лунку серийных разведений вариантов антител к человеческому CD20 IgG1- и IgG4-изотипа в ЗФРТ/0,2% BSA в течение 1 ч при КТ, с последующей инкубацией при встряхивании с применяемыми из расчета 100 мкл/лунку мономерных или димерных, меченных His, биотинилированных на С-конце

25 вариантов ECD Fc $\gamma$ R (1 мкг/мл) в ЗФРТ/0,2% BSA в течение 1 ч при КТ. И, наконец, после описанной выше промывки планшеты инкубировали при встряхивании, используя 100 мкл/лунку стрептавидина-полиHRP (фирма CLB, каталожный № M2032, 1:10000) в ЗФРТ/0,2% BSA, в качестве

30 идентифицирующего антитела, в течение 30 мин при КТ. Проявление с использованием АВТС в дозе 1 мг/мл (каталожные №№ 11112422001 и 11112597001, фирма Roche) проводили в течение приблизительно 10 мин (Ia), 15 мин (IIa-131H, IIa-131R, IIIa-158V, IIIa-158F) или 30 мин (IIb). Затем реакции прекращали, используя 100 мкл/лунку 2%-ной щавелевой кислоты (фирма Riedel de Haen, каталожный № 33506). Абсорбцию измеряли при 405 нм с помощью

ридера для микропланшетов (фирма BioTek, Виноски, шт. Вермонт).

Для оценки иммобилизации вариантов антител и решения вопроса о том, могут ли интродуцированные неактивирующие мутации влиять на связывание (захват) с планшетом для ELISA, 96-луночные планшеты для ELISA типа

5 Microlon (фирма Greiner, каталожный № 655092) сенсibilизировали в течение  
ночи при 4°C применяемым в концентрации 1 мкг/мл козьим F(ab')<sub>2</sub> к  
человеческому IgG-F(ab')<sub>2</sub> (фирма Jackson Laboratory, каталожный № 109-006-  
097) в ЗФР. Затем планшеты для ELISA промывали и блокировали, используя  
10 200 мкл/лунку ЗФР, дополненного 0,2% BSA (ЗФР/0,2% BSA), в течение 1 ч при  
комнатной температуре (КТ). Осуществляя промывки между различными  
стадиями инкубациями (ЗФР, дополненный 0,05% Твин 20 (ЗФРТ); плюс 0,2%  
BSA; ЗФРТ/0,2% BSA), затем планшеты инкубировали при встряхивании,  
используя 100 мкл/лунку серийных разведений вариантов антител к  
15 человеческому CD20 IgG1- и IgG4-изотипа (0,0013-20 мкг/мл, полученные с  
помощью стадий пятикратных разведений) в ЗФРТ/0,2% BSA в течение 1 ч при  
КТ, и инкубировали при встряхивания, используя 100 мкл/лунку меченного HRP  
козьего античеловеческого-IgG-Fcγ (каталожный № 109-035-098, фирма Jackson  
Laboratory; 1:10000) в ЗФРТ/0,2% BSA в качестве идентифицирующего антитела  
15 в течение 30 мин при КТ. Осуществляли проявление с использованием ABTS в  
дозе 1 мг/мл (каталожные №№ 11112422001 и 11112597001, фирма Roche) в  
течение примерно 5 мин и затем реакции прекращали, используя 100 мкл/лунку  
2%-ной щавелевой кислоты. Абсорбцию измеряли при 405 нм с помощью ридера  
для микропланшетов.

20 Данные анализировали с использованием нелинейной модели зависимости  
ответа от дозы агониста, и для каждой экспериментальной повторности  
рассчитывали площадь под кривой (AUC), построенной с использованием  
преобразованных в log концентраций, с помощью GraphPad PRISM (версия 8.4.1,  
фирма GraphPad Software) с использованием в качестве исходного уровня  
25 ELISA-сигнала (контроль без антитела), с последующей стандартизацией каждой  
экспериментальной повторности относительно значения AUC, измеренного для  
варианта антитела дикого типа IgG1-изотипа (IgG1 к человеческому CD20,  
100%). Данные получены по трем независимым повторностям.

30 Варианты антител к человеческому CD20 IgG1- и IgG4-изотипа  
иммобилизовывались на планшетах для ELISA сходным образом с небольшим  
снижением, обнаруженным для вариантов антител с каркасом IgG4 (фиг. 5).  
Таким образом, сделано заключение о том, что неактивирующие мутации в  
областях тяжелых цепей вариантов антител к человеческому CD20 IgG1- и IgG4-

изотипа не влияли на иммобилизацию с помощью античеловеческих-IgG-F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов. Оценка связывания с помощью ELISA вариантов IgG1 к человеческому CD20 с FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIIIa продемонстрировала, что все варианты антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа, несущие неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, не взаимодействовали с Fcγ-рецепторами (фиг. 6А-Е). Кроме того, неактивирующие варианты IgG4 также не обладали способностью взаимодействовать с Fcγ-рецепторами за исключением варианта антитела IgG4-изотипа, несущего мутации S228P-E233P-F234V-L235A-delG236, для которого обнаружено остаточное связывание с FcγRIIa-131R (фиг. 6В).

Таким образом, у варианта антитела IgG1-изотипа, несущего неактивирующие мутации L234F-L235E-G236R, обнаружено отсутствие связывания с FcγR, аналогично описанному ранее для неактивирующих Fc-вариантов, таких как L234F-L235E-D265A и L234A-L235A-P329G.

15 Пример 7: Активация и передача сигналов через Fcγ-рецепторы антителами к человеческому CD20 и их неактивирующими вариантами

В примере 6 представленные данные об изучении связывания антител к человеческому CD20 IgG1- или IgG4-изотипа и их вариантов, несущих неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, с FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIIIa. Все протестированные неактивирующие варианты антител характеризовались отсутствием связывания с протестированными FcγR за исключением варианта антитела IgG4-изотипа, несущего мутации S228P-E233P-F234V-L235A-delG236, для которого обнаружено остаточное связывание с FcγRIIa-131R. Однако с помощью анализов связывания на основе ELISA оценивали только воздействие на непосредственное связывание. Воздействия связанной с антигеном опосредованной мишенью кластеризации антител и последующей опосредованной мишенью кластеризации Fc-рецепторов на эффекторных клетках, не были изучены. При создании изобретения изучали вопрос о том, может ли интродукция неактивирующих мутаций в константную область тяжелой цепи антител к человеческому CD20 IgG1- или IgG4-изотипа, указанных в примере 6, оказывать воздействие на активацию и передачу сигналов FcγR, с использованием репортерных анализов

фирмы Promega, в которых применяли экспрессирующие мишень клетки Raji и репортерную линию клеток Jurkat, экспрессирующую требуемый FcγR.

Активацию FcγR-опосредуемой передачи сигналов указанными выше вариантами антител к человеческому CD20 IgG1- и IgG4-изотипа оценивали количественно с помощью репортерных биоанализов (фирма Promega, FcγRIa: каталожный № CS1781C08; FcγRIIa аллотипа 131H: каталожный № G9991; FcγRIIa аллотипа 131R: каталожный № CS1781B08; FcγRIIb: каталожный № CS1781E04; FcγRIIIa аллотипа 158F: каталожный № G9790; FcγRIIIa аллотипа 158V: каталожный № G7010) с использованием в качестве клеток-мишеней экспрессирующих CD20 клеток Raji. В качестве эффекторных клеток применяли набор репортерных клеток, содержащих человеческие Т-клетки линии Jurkat, сконструированные для стабильной экспрессии требуемого FcγR, и реагирующий элемент, представляющий собой ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT), запускающий экспрессию люциферазы светляка. Анализ осуществляли согласно рекомендациям производителя. В целом, метод состоял в следующем: клетки Raji (5000 клеток/лунку) высевали в 384-луночные белые планшеты OptiPlates (фирма Perkin Elmer, каталожный № 6007290) в буфере для анализа (фирма Promega, каталожный № G719A), дополненном 12% сыворотки с низким уровнем IgG (фирма Promega, каталожный № G711A), и инкубировали в течение 5 ч при 37/5% CO<sub>2</sub> в общем объеме 30 мкл, содержащем серии концентраций антигенов (FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIIIa, конечные концентрации 0,001-15 мкг/мл, 5-кратные разведения; FcγRIa, конечные концентрации 0,00000006-15 мкг/мл, 25-кратные разведения), и подвергнутые оттаиванию эффекторные клетки из набора для биоанализа фирмы Promega (30000 клеток/лунку). Затем планшеты инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре (КТ), после чего добавляли 30 мкл реагента для анализа люциферазы Bio Glo. Затем планшеты инкубировали в течение 5 мин при КТ. Производство люциферазы оценивали количественно по люминесценции, измеренной с помощью многофункционального ридера EnVision (фирма Perkin Elmer). Исходный люминесцентный сигнал, определенный при применении образцов, содержащих только среду (без клеток Raji, без антител, без эффекторных клеток), применяли для стандартизации люминесцентных сигналов. Данные анализировали с использованием нелинейной модели

зависимости ответа от дозы агониста, и для каждой экспериментальной  
повторности рассчитывали площадь под кривой (AUC), построенной с  
использованием преобразованных в log концентраций, с помощью GraphPad  
PRISM (версия 8.4.1, фирма GraphPad Software) с использованием в качестве  
5 контроля образца без антитела (только клетки Raji и эффекторные клетки). В  
каждом эксперименте значения AUC стандартизовали относительно репортерной  
активности, обнаруженной для клеток, которые инкубировали с  
несвязывающимся контролем IgG1-b12 (0%), и активности IgG1 дикого типа к  
человеческому CD20 (100%). Данные получены по трем независимым  
10 повторностям.

Оценка опосредуемой FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIIIa активации с  
использованием репортерных анализов фирмы Proomega продемонстрировала,  
что интродукция L234F-L235E-G236R в комбинации с мутацией K409R в  
константную область тяжелой цепи IgG1 предупреждала опосредуемую FcγR  
15 активацию, сходную с активацией, опосредуемой неактивирующими вариантами  
IgG1 к человеческому CD20 L234F-L235E-D265A-K409R, L234A-L235A-P329G-  
K409R, G236R-L328R-K409R и E233P-L234V-L235A-G236del-S267K-K409R  
(фиг. 7А-Е). Отсутствие опосредуемой FcγR активации обнаружено также для  
других вариантов антител IgG1- или IgG4-изотипа, несущих неактивирующие  
20 мутации в константной области тяжелой цепи, за исключением частичной  
активации, опосредуемой через FcγRIa вариантом антитела к человеческому  
CD20 IgG1-изотипа, несущим мутации N297G и K409R (фиг. 7А), и частичной  
опосредуемой FcγRIIa и FcγRIIb активации вариантами антител IgG4-изотипа,  
несущими мутации S228P-F234A-L235A или S228P-E233P-F234V-L235A-  
25 G236del, и вариантом антитела к человеческому CD20 IgG1-изотипа, несущим  
мутации L234A-L235E-G237A-A330S-P331S-K409R (фиг. 7Б-Г). Применяемые в  
качестве контроля варианты антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа и к  
человеческому CD20 IgG1-K409R индуцировали активацию всех  
протестированных FcγR, в то время как варианты антител IgG4-изотипа и IgG4-  
30 S228P индуцировали опосредуемую FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIa активацию, но не  
опосредуемую FcγRIIIa активацию (фиг. 7А-Е).

Принимая во внимание, что при применении нескольких вариантов, для  
одного или нескольких Fcγ-рецепторов обнаружена активация, опосредуемая

Fc $\gamma$ R, т.е. вариантов IgG1, несущих мутации N297G-K409R или L234A-L235E-G237A-A330S-P331S-K409R, и вариантов антитела IgG4-изотипа, несущих мутации S228P-F234A-L235A или S228P-E233P-F234V-L235A-G236del преимущественно, удалось эффективно элиминировать способность индуцировать опосредуемую Fc $\gamma$ R активацию вариантами антител IgG1-изотипа, несущими новые неактивирующие мутации L234F-L235E-G236R в константной области тяжелой цепи в дополнение к мутации K409R.

Пример 8: Связывание с неонатальным Fc-рецептором антител к человеческому CD20 и их неактивирующих вариантов

Неонатальный Fc-рецептор (FcRn) ответствен за время полужизни в плазме IgG путем защиты IgG от расщепления. После интернализации антитела FcRn контактирует Fc-областями антител в эндосомах, при этом взаимодействие является стабильным в слабокислой среде (pH 6,0). После рециклинга на плазматической мембране, где окружающая среда является нейтральной (pH 7,4), взаимодействие нарушается, и антитело высвобождается обратно в кровоток. Это влияет на время полужизни IgG в плазме. В настоящем изобретении применяли ELISA для оценки связывания с человеческим FcRn антител к человеческому CD20 IgG1- и IgG4-изотипов и их вариантов, указанных в примерах 6 и 7, содержащих неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи.

96-луночные планшеты Streptawell (фирма Roche, каталожный № 1734776001) сенсibilizировали, используя 5 мкг/мл (100 мкл/луноку) полученного с помощью рекомбинации биотинилированного внеклеточного домена человеческого FcRn (FcRnECDHis-B2M-BIO), т.е. внеклеточного домена человеческого FcRn с C-концевой His-меткой (FcRnECDHis; SEQ ID NO: 21), в виде димера с бета-2-микроглобулином (B2M; SEQ ID NO: 22), разведенного в ЗФР, дополненном 0,05% Твин 20 (ЗФРТ) плюс 0,2% BSA, в течение 2 ч при встряхивании при комнатной температуре (КТ). Затем планшеты промывали трижды ЗФРТ. Добавляли полученные серийным разведением образцы антител (конечные концентрации 0,0013-20 мкг/мл, 5-кратное разведение в ЗФРТ/0,2% BSA, pH 6,0 или pH 7,4) и инкубировали в течение 1 ч при встряхивании при КТ. Планшеты промывали ЗФРТ/0,2% BSA, pH 6,0 или pH 7,4. Добавляли конъюгированное с пероксидазой из хрена (HRP) поликлональное козье

антитело к человеческой легкой каппа-цепи (1:5000; фирма Sigma, каталожный № А-7164), разведенное в ЗФРТ/0,2% BSA, рН 6,0 или рН 7,4, и планшеты инкубировали при встряхивании в течение 1 ч при КТ. После промывки ЗФРТ/0,2% BSA, рН 6,0 или рН 7,4 добавляли в качестве субстрата 100 мкл 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты (ABTS; 1 мг/мл; фирма Roche, каталожные №№ 11112422001 и 11112597001) и планшеты инкубировали в течение 15 мин при КТ, защищая от действия света. Реакцию прекращали, используя 100 мкл 2%-ной щавелевой кислоты (фирма Riedel de Haen, каталожный № 33506), инкубировали в течение 10 мин при КТ. Абсорбцию определяли при 404 нм, используя ридер для микропланшетов (BioTek, Виноски, шт. Вермонт). Данные анализировали с использованием нелинейной модели зависимости ответа от дозы агониста, и для каждой экспериментальной повторности рассчитывали площадь под кривой (AUC), построенной с использованием преобразованных в log концентраций, с помощью GraphPad PRISM (версия 8.4.1, фирма GraphPad Software) с использованием в качестве исходного уровня ELISA-сигнала (контроль без антитела). Данные получены по трем независимым повторностям.

Предназначенный для оценки связывания FcRn анализ ELISA продемонстрировал, что интродукция неактивирующих мутаций в константную область тяжелой цепи антител к человеческому CD20 IgG1- или IgG4-изотипа не ингибировал связывание FcRn при рН 6,0. В противоположность этому, установлено, что при рН 7,4 все протестированных варианты антител IgG1- или IgG4-изотипа, включая антитела к человеческому CD20 дикого типа IgG1-и IgG4-изотипа, не связывались с человеческим FcRn.

В совокупности эти результаты продемонстрировали, что аналогично другим протестированным вариантам, вариант антитела IgG1-изотипа, несущий новые неактивирующие мутации L234F-L235E-G236R, сохранял способность связываться с FcRn, сходную со способностью антитела дикого типа IgG1-изотипа.

Пример 9: Индукция антитело-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичности антителами к человеческому CD20 и их неактивирующими вариантами

Связывание с FcγR и активацию и передачу сигналов, индуцируемые неактивирующим антителом к человеческому CD20, оценивали в примерах 6 и 7 соответственно. Опосредуемая естественными клетками-киллерами (NK) антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC) зависит от контакта с FcγRIIIa. При создании изобретения способность индуцировать ADCC IgG1 к человеческому CD20 дикого типа, IgG1-K409R, его неактивирующих вариантов, несущих мутации L234F-L235E-D265A-K409R, L234F-L235E-G236R-K409R, L234A-L235A-P329G-K409R, G236R-L328R-K409R, E233P-L234V-L235A-G236del-S267K-K409R, N297G-K409R, L234A-L235E-G237A-A330S-P331S-K409, а также IgG4 дикого типа, IgG4-S228P, и его неактивирующих вариантов, несущих мутации S228P-F234A-L235A или S228P-E233P-F234V-L235A-G236del, оценивали с использованием анализа цитотоксичности фирмы Perkin Elmer DELFIA® EuTDA TRF (флуоресценция с временным разрешением) с использованием экспрессирующих CD20 клеток Raji и мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) в качестве источника NK-клеток.

Лейкоцитарные пленки (банк крови Sanquin) получали из цельной крови здоровых доноров, применяли в качестве антикоагулянта цитратно-фосфатную декстрозу (конечная концентрация 20 об.%) для предупреждения активации коагуляции и разводили в 3,6-раза в забуференном фосфатом физиологическом растворе (ЗФР, каталожный № SH3A3830.03, фирма GE Healthcare). Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из разведенных ЗФР лейкоцитарных пленок путем центрифугирования в градиенте плотности, используя пробирки Leucoser™ (каталожный № 227290, фирма Greiner Bio-One), содержащие среду для разделения лимфоцитов (каталожный № 25-072-C1, фирма Corning), согласно инструкциям производителя с некоторыми модификациями. В целом, метод состоял в следующем: центрифугирование в градиенте плотности осуществляли путем центрифугирования в градиенте плотности в течение 20 мин при  $800 \times g$  при комнатной температуре (КТ) с режимом торможения центрифуги, установленным на 3. Затем обогатившую

клеточную фракцию промывали 3 раза 50 мл ЗФР с последующим центрифугированием в течение 10 мин при  $300 \times g$ . Выделенные РВМС ресуспендировали в культуральной среде (RPMI-1640 с 2мМ L-глутамином и 25мМ Нерес, каталожный № BE12-115F, фирма Lonza; дополненной 10% донорской бычьей сыворотки с железом, DBSI, каталожный № 20371, фирма Life Technologies). Для оценки ADCC-активности антител к CD20 дикого типа и их неактивирующих вариантов применяли набор для определения цитотоксичности DELFIA® EuTDA TRF (флуоресценция с временным разрешением) (каталожный № AD0116, фирма Perkin Elmer) согласно инструкциям производителя.

10 Осуществляли две отдельные группы экспериментов.

При осуществлении первой группы экспериментов клетки Raji ресуспендировали в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл в культуральной среде и метили с помощью 0,16 об.% раствора реагента бис(ацетоксиметил)-2,2':6',2''-терпиридин-6,6''-дикарбоксилата (реагент DELFIA BATDA, каталожный № C136-100, фирма Perkin Elmer) в течение 20 мин при 37°C в водяной бане. Гидрофобная метка BATDA может свободно проникать через клеточную мембрану и превращается внутри клетки в гидрофильную метку TDA (2,2':6',2''-терпиридин-6,6''-дикарбоновая кислота), которая уже не обладает способностью проникать через клеточную мембрану. Затем меченые клетки промывали трижды культуральной средой для удаления избытка реагента BATDA. Затем клетки смешивали с антителами к CD20 дикого типа и их неактивирующими вариантами, применяемыми в диапазоне концентраций (конечные концентрации 0,01-10000 нг/мл, 10-кратные разведения), инкубировали в течение 15 мин при КТ и к смеси добавляли свежевыделенные РВМС, используя соотношение Е:Т, составляющее 100:1, в культуральной среде в общем объеме 200 мкл, в 96-луночный планшет с V-образным дном (каталожный № 651101, фирма Greiner bio-one). Планшеты инкубировали в течение 2 ч при 37°C в увлажненной (85%) воздушной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Спонтанное высвобождение BATDA из меченых клеток, соответствующее 0% ADCC, определяли в отсутствии РВМС и антител, а максимальное высвобождение BATDA, соответствующее 100% ADCC, определяли путем инкубации меченых клеток с буфером для лизиса DELFIA® (конечная концентрация 5 об.%, каталожный № 4005-0010, фирма Perkin Elmer). Через 2 ч планшеты перемешивали в течение 5 мин при 500

× g и 20 мкл бесклеточного супернатанта переносили в плоскодонный 96-луночный непрозрачный планшет белого цвета OptiPlate (каталожный № 6005290, фирма Perkin Elmer). Затем добавляли 200 мкл раствора европия DELFIA (каталожный № C135-100, фирма Perkin Elmer) к перенесенному супернатанту и образцы инкубировали в течение 15 мин при КТ в темноте. Флуоресценцию хелатов EuTDA, образовавшихся из высвободившейся TDA-метки, измеряли с помощью многофункционального ридера для микропланшетов EnVision (фирма Perkin Elmer). Процент специфического высвобождения в качестве показателя ADCC, рассчитывали с помощью следующей формулы:

10           % специфического высвобождения = ((флуоресценция образца - спонтанно высвободившаяся флуоресценция) / (максимальная флуоресценция - спонтанно высвободившаяся флуоресценция)) × 100%

Данные анализировали с использованием нелинейной модели зависимости ответа от дозы агониста, и для каждой экспериментальной повторности рассчитывали площадь под кривой (AUC), построенной с использованием преобразованных в log концентраций, с помощью GraphPad PRISM (версия 8.4.1, фирма GraphPad Software) с использованием в качестве исходного уровня окрашивания (контроль без антитела), с последующей стандартизацией каждой экспериментальной повторности относительно значения AUC, измеренного для несвязывающегося отрицательного контроля IgG1-b12 (0%), и значения AUC, измеренного для варианта антитела дикого типа IgG1-изотипа (IgG1 к человеческому CD20, 100%). Данные представляют собой средние значения (± SEM), полученные для четырех (дикий тип и K409R-варианты) или двух (варианты L234F-L235E-D265A-K409R и L234F-L235E-G236R-K409R) независимых доноров.

Вторую группу экспериментов осуществляли и анализировали практически как описано выше. Однако вместо использования диапазона концентраций, способность антител к человеческому CD20 IgG1- или IgG4- изотипа и их вариантов, несущих неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, индуцировать ADCC оценивали с использованием конечной концентрации антител, составляющей 10 мкг/мл. Данные стандартизовали в каждой экспериментальной повторности относительно несвязывающегося отрицательного контроля IgG1-b12 (0%) и варианта антитела дикого типа IgG1-

изотипа (IgG1 к человеческому CD20, 100%) и визуализировали с помощью GraphPad PRISM (версия 8.4.1, фирма GraphPad Software). Данные представляют собой средние значения ( $\pm$  SEM), полученные в двух независимых экспериментах.

5 Оценка опосредуемой NK ADCC с использованием набора для оценки цитотоксичности Elmer DELFIA® EuTDA TRF фирмы Perkin продемонстрировала, что IgG1 к человеческому CD20 дикого типа или его вариант, несущий мутацию K409R, эффективно индуцировал ADCC в отношении экспрессирующих CD20 клеток Raji (фиг. 8). В противоположность  
10 этому, в соответствии с отсутствием связывания и активации и передачи сигналов через Fc $\gamma$ RIIIa (примеры 6 и 7), антитело к человеческому CD20 дикого типа IgG4-изотипа или его вариант, несущий стабилизирующую шарнир мутацию S228P, не индуцировало опосредуемую NK-клетками ADCC (фиг. 8Б). Оценка способности индуцировать ADCC неактивирующими вариантами антител  
15 показала, что интродукция мутаций L234F-L235E-G236R и K409R в константную область тяжелой цепи IgG1 к человеческому CD20 снижала ADCC в отношении экспрессирующих CD20 клеток Raji на ~69-98%, что сходно со способностью неактивирующего варианта IgG1 к человеческому CD20 L234F-L235E-D265A-K409R (фиг. 8А, Б) и неактивирующих вариантов IgG1 к  
20 человеческому CD20 с мутациями L234A-L235A-P329G-K409R, G236R-L328R-K409R, E233P-L234V-L235A-G236del-S267K-K409R, N297G-K409R, L234A-L235E-G237A-A330S-P331S-K409R (фиг. 8Б). Кроме того, аналогично IgG4 дикого типа, варианты неактивирующих антител IgG4-изотипа S228P-F234A-L235A или S228P-E233P-F234V-L235A-G236del также не обладали способностью  
25 индуцировать ADCC (фиг. 8Б).

Таким образом, способность индуцировать ADCC эффективно элиминировалась у вариантов антител, несущих новые неактивирующие мутации L234F-L235E-G236R в константной области тяжелой цепи.

30 Пример 10: Т-клеточная активация в культуре PBMC антителами к человеческому CD3 и их неактивирующими вариантами

Оценивали повышающую регуляцию CD69 на Т-клетках в качестве показателя ранней активации Т-клеток антителами к человеческому CD3 huCLB-

T3/4 IgG1- и IgG4-изотипа и их вариантами, несущими неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, используя FACS-анализ.

РВМС выделяли из лейкоцитарных пленок путем разделения в градиенте плотности согласно методу, описанному в примере 9, промывали ЗФР и ресуспендировали в культуральной среде (RPMI-1640 с 2мМ L-глутамином и 25мМ Нерес, каталожный № BE12-115F, фирма Lonza; дополненной 10% донорской бычьей сыворотки с железом, DBSI, каталожный № 20371, фирма Life Technologies). Предназначенные для оценки зависимости ответа от дозы серии антител к человеческому CD3 IgG1-F405L и их неактивирующих вариантов, несущих мутации L234F-L235E-D265A, L234F-L235E-G236R, L234A-L235A-P329G, G236R-L328R, E233P-L234V-L235A-G236del-S267K или L234A-L235E-G237A-A330S-P331S в дополнение к F405L, а также IgG4 к человеческому CD3 со стабилизирующей шарнир мутацией S228P или его неактивирующих вариантов, несущих мутации S228P-E233P-F234V-L235A-G236del или S228P-F234A-L235A в дополнение к F405L и R409K, приготавливали в культуральной среде (конечные концентрации 0,001 – 1000 нг/мл, 10-кратные разведения) и вносили в лунки 96-луночного круглодонного планшета, содержащего РВМС ( $1,5 \times 10^5$  клеток/лунку) в культуральной среде. После инкубации в течение 16-24 ч клетки пеллетировали центрифугированием. После этого клетки промывали FACS-буфером (1× ЗФР, каталожный № BE17-517Q, фирма Lonza; 0,1% бычьего сывороточного альбумина, BSA; 0,02% NaN<sub>3</sub>, каталожный № 41920044-3, фирма Bio-world) и окрашивали в течение 30 мин при 4°C мышинным антителом к человеческому CD28, конъюгированным с PE (каталожный № 130-092-921; фирма Miltenyi Biotec; Т-клеточный маркер) и мышинным антителом к человеческому CD69, конъюгированным с APC (каталожный № 340560; фирма BD Biosciences). Несвязанные антитела удаляли путем двукратной промывки FACS-буфером и после этого клетки ресуспендировали в FACS-буфере (150 мкл/лунку) и определяли процент CD69-позитивных клеток среди CD28-позитивных клеток в смеси РВМС с помощью проточного цитометра Fortessa (фирма BD). Данные визуализировали в виде зависимости ответа от дозы относительно процента CD69<sup>+</sup>-клеток среди CD28<sup>+</sup>-клеток, и для каждого донора РВМС и для каждой экспериментальной повторности рассчитывали площадь под кривой (AUC), построенной с

использованием преобразованных в log концентраций, с помощью GraphPad PRISM (версия 8.4.1, фирма GraphPad Software), используя в качестве исходного уровня фоновое окрашивание (контроль без антитела), с последующей стандартизацией для каждого донора в каждой экспериментальной повторности относительно значения AUC, измеренного для варианта антитела дикого типа IgG1-изотипа (IgG1-F405L, 100%). Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM, полученные для 6 доноров по трем независимым повторностям.

Оценка повышающей регуляции CD69 на Т-клетках в качестве показателя ранней активации Т-клеток продемонстрировала, что антитело к человеческому CD3 IgG1-изотипа, несущее неактивирующие мутации L234F-L235E-G236R в дополнение к мутации F405L, предупреждало повышающую регуляцию CD69 на Т-клетках в совместной культуре PBMC, аналогично другим протестированным вариантам, т.е. вариантам антител к человеческому CD3 IgG1-F405L, которые включают неактивирующие мутации L234F-L235E-D265A, L234A-L235A-P329G, G236R-L328R, E233P-L234V-L235A-G236del-S267K или L234A-L235E-G237A-A330S-P331S, а также варианту к человеческому CD3 IgG4-F405L-R409K, который включает неактивирующие мутации S228P-E233P-F234V-L235A-G236del (фиг. 9А, Б). В противоположность этому, вариант антитела к человеческому CD3 IgG1-изотипа, несущий N297G с мутацией F405L, и вариант антитела к человеческому CD3 IgG4-изотипа, несущий мутации S228P-F234A-L235A с мутациями F405L-R409K, не обладали способностью предупреждать повышающую регуляцию CD69 на Т-клетках в совместной культуре PBMC.

В целом, активацию Т-клеток, измеренную по повышающей регуляции CD69 в совместной культуре PBMC, можно предупреждать путем интродукции новых неактивирующих мутаций L234F-L235E-G236R в антитело к человеческому CD3 IgG1-изотипа.

Пример 11: Опосредуемая Т-клетками цитотоксичность *in vitro*, индуцированная неактивирующими вариантами антител

В примере 10 продемонстрировано, что интродукция неактивирующих мутаций L234F-L235E-G236R в константную область тяжелой цепи вариантов антител IgG1-изотипа, мишенью которого является CD3, может эффективно предупреждать активацию Т-клеток. В настоящем исследовании опосредуемую

Т-клетками цитотоксичность оценивали для биспецифических антител CD3xHER2, CD3xb12 и b12xHER2 дикого типа IgG1- и IgG4-изотипа и их вариантов, несущих неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи.

5           Биспецифические молекулы создавали путем контролируемого обмена Fab-плечей (сFAE), описанного в примере 1. Оценивали опосредуемую Т-клетками цитотоксичность, индуцированную биспецифическими антителами дикого типа CD3xHER2 (IgG1 или IgG4 к человеческому CD3 (huCLB-T3/4) и IgG1 или IgG4 к человеческому HER2), CD3xb12 (IgG1 или IgG4 к человеческому CD3 (huCLB-T3/4) и применяемым в качестве несвязывающегося контрольного антитела IgG1 или IgG4 к HIV1 gp120 (b12), или b12xHER2 (несвязывающееся контрольное антитело IgG1 или IgG4 анти-HIV1 gp120 (b12) и IgG1 или IgG4 к человеческому HER2) и их вариантами, несущими неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи. РВМС выделяли из лейкоцитарных пленок здоровых 10           доноров путем разделения в градиенте плотности, описанного в примере 9, промывали ЗФР и ресуспендировали в культуральной среде (RPMI-1640 с 2мМ L-глутамином и 25мМ Нерес; дополненной 10% донорской бычьей сыворотки с железом, (DBSI)). Экспрессирующие HER2 клетки SK-OV-3 (каталожный № НТВ-77, АТСС) культивировали в среде Маккоя 5А (фирма Lonza, каталожный № BE12-168F), дополненной 10 об.% инактивированной тепловой 20           обработкой DBSI и пенициллином-стрептомицином (Pen/Strep, конечная концентрация 50 ед./мл калиевого пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина сульфата (фирма Lonza, каталожный № DE17-603E), и выдерживали при 37°С в увлажняющей камере в атмосфере с 5 об. % CO<sub>2</sub>. Клетки SK-OV-3 25           культивировали практически до конfluence. Клетки обрабатывали трипсином и ресуспендировали в культуральной среде и затем пропускали через клеточное сито с получением суспензии единичной клетки. Высеивали 2,5×10<sup>4</sup> SK-OV-3-клеток в каждую лунку 96-луночного культурального планшета и клетки инкубировали в течение 4 ч при 37°С, 5% CO<sub>2</sub>, давая им прикрепиться к 30           планшету. Затем 1×10<sup>5</sup> РВМС добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета, содержащего SK-OV-3-клетки-мишени, получая соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней (Е:Т) 4:1. Затем приготавливали предназначенные для оценки зависимости ответа от дозы серии

- биспецифических антител CD3xHER2, CD3xb12 и b12xHER2 дикого типа и их неактивирующих вариантов, указанных выше, в культуральной среде (конечные концентрации 0,001 – 1000 нг/мл, 10-кратные разведения) и добавляли в лунки 96-луночных культуральных планшетов, содержащих клетки SK-OV-3 и PBMC.
- 5 Результаты, полученные при инкубации SK-OV-3-клеток-мишеней с 2мкМ стауроспорином (каталожный № S6942-200, фирма Sigma) применяли в качестве показателя 100%-ного цитолиза опухолевых клеток. Результаты, полученные при использовании только среды (SK-OV-3-клетки, без антитела, без PBMC) применяли в качестве показателя 0%-ного цитолиза опухолевых клеток.
- 10 Планшеты инкубировали в течение 3 дней при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Через три дня планшеты промывали дважды ЗФР, и в каждую лунку добавляли 150 мкл культуральной среды, содержащей 10% Alamar blue (фирма Invitrogen, каталожный № DAL1100). Планшеты инкубировали в течение 4 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Изменяли абсорбцию при 590 нм. (фирма Envision, Perkin Elmer, Уолтем, шт. Массачусетс). Данные визуализировали с помощью PRISM (версия 8.4.1, фирма GraphPad Software) в виде зависимости от дозы ответа в виде процента жизнеспособных клеток SK-OV-3 и рассчитывали для каждого донора и каждой экспериментальной повторности. Данные представляют собой средние значения ± SEM, полученные по трем независимым повторностям.
- 15
- 20 Все варианты биспецифических антител CD3xHER2, несущие неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, индуцировали зависящую от дозы цитотоксичность SK-OV-3-клеток с эффективностью, сопоставимой с эффективностью варианта биспецифического антитела CD3xHER2, имеющего Fc-область с функцией, аналогичной дикому типу, т.е.
- 25 без неактивирующих мутаций (фиг. 10А). Биспецифическое антитело CD3xb12, аналогичное дикому типу, индуцировало неспецифический цитолиз SK-OV-3-клеток, хотя и в меньшей степени, чем вариант аналогичного дикому типу биспецифического антитела CD3xHER2. В противоположность этому, для варианта биспецифического антитела CD3xb12, несущего неактивирующие
- 30 мутации L234F-L235E-G236R, установлено отсутствие цитотоксичности в отношении SK-OV-3-клеток, также как и у других протестированных неактивирующих биспецифических вариантов CD3xb12, за исключением биспецифического антитела CD3xb12, несущего мутацию N297G, для которого

все еще обнаружена частичная неспецифическая цитотоксичность в отношении SK-OV-3-клеток при применении в самой высокой из протестированных концентраций (фиг. 10Б). Это согласуется с данными об активации (повышающая регуляция CD69) Т-клеток в совместной культуре РВМС, что  
5 указано для этого варианта в примере 10. Небольшой уровень неспецифической цитотоксичности в отношении SK-OV-3-клеток обнаружен у аналогичного дикому типу варианту биспецифического антитела b12xHER2. Неспецифическая цитотоксичность не обнаружена у других протестированных вариантов биспецифического антитела b12xHER2, за исключением остаточной  
10 неспецифической цитотоксичности биспецифического варианта b12xHER2, несущего мутации E233P-L234V-L235A-G236del-S267K (фиг. 10В).

В целом, интродукция новых мутаций L234F-L235E-G236R в константную область тяжелой цепи вариантов биспецифических антител, таргетирующих раковый антиген и Т-клетки, позволяет эффективно избегать неспецифической  
15 цитотоксичности и сохранять способность индуцировать специфическую опосредуемую Т-клетками цитотоксичность.

Пример 12: Фармакокинетический (ФК) анализ неактивирующих вариантов антител

Фармакокинетические свойства вариантов антител к человеческому CD3 (huCLB-T3/4) и к человеческому CD20 IgG1-изотипа, несущих неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, анализировали в опытах на мышах.

Применяемых в этом исследовании мышей содержали в Центральном лабораторном центре для животных (Утрехт, Нидерланды). Всех мышей  
25 содержали индивидуально в вентилируемых клетках со свободным доступом к корму и воде. Все эксперименты проводили в соответствии с Голландским законом о защите животных (WoD), переведенному из директив (2010/63/EU), и были одобрены Голландской центральной комиссией по экспериментам на животных и местным комитетом по этике. SCID-мышам (C.B-17/IcrHan@Hsd-Prkdc<sup>scid</sup>, фирма Envigo) инъекцировали внутривенно 500 мкг антитела (IgG1  
30 дикого типа к человеческому CD3, его варианты, несущие мутацию F405L индивидуально или в комбинации с неактивирующими мутациями L234F-L235E-D265A или L234F-L235E-G236R, IgG1 дикого типа к человеческому CD20 и его

варианты, несущие мутацию K409R индивидуально или в комбинации с неактивирующими мутациями L234F-L235E-D265A или L234F-L235E-G236R), используя по 3 мыши на группу. Образцы крови (50 мкл) получали из лицевой вены через 10 мин, 4 ч, 1 день, 2 дня, 8 дней, 14 дней и 21 день после введения антитела. Кровь собирали во флаконы, содержащие гепарин, и затем центрифугировали в течение 5 мин при 10000 g. Плазму хранили при -20°C вплоть до определения концентраций антител.

С помощью ELISA для всех hIgG определяли концентрации конкретного человеческого IgG. Античеловеческим IgG (каталожный № M9105, партия № 8000260395 фирма Sanquin, Нидерланды) сенсibilизировали 96-луночные планшеты Microton для ELISA (фирма Greiner, Германия) в концентрации 2 мкг/мл, который применяли в качестве захватывающего антитела. Затем планшеты блокировали ЗФР, дополненным 0,2% BSA, с последующим добавлением образцов, серийно разведенных в буфере для ELISA (ЗФР, дополненный 0,05% Твин 20 и 0,2% бычьего сывороточного альбумина), и инкубировали в шейкере для планшетов в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ). Затем планшеты инкубировали с козьим античеловеческим иммуноглобулином IgG (каталожный № 109-035-098, фирма Jackson) и проявляли с использованием 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоной кислоты; ABTS; фирма Roche). Реакцию прекращали, добавляя 2%-ную щавелевую кислоту (фирма Riedel de Haen, каталожный № 33506). Для получения контрольной кривой использовали соответствующие продукты, применяемые для инъекции. Абсорбцию измеряли с помощью ридера для микропланшетов (фирма BioTek, Виноски, шт. Вермонт) при 405 нм.

Сывороточные концентрации антитела IgG-типа к человеческому CD20 IgG1-изотипа и его вариантов, несущих мутации K409R, L234F-L235E-D265A-K409R или L234F-L235E-G236R-K409R (фиг. 11А), а также сывороточные концентрации антитела IgG-типа к человеческому CD3 IgG1-изотипа и его вариантов, несущих мутации F405L, L234F-L235E-D265A-F405L или L234F-L235E-G236R-F405L (фиг. 11Б), оказались сопоставимыми. Измеренные концентрации IgG в плазме для всех инъецированных в мышей вариантов антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа и к человеческому CD3 IgG1-изотипа, согласовывались с концентрациями, предсказанными с помощью 2-

компаративной модели фармакокинетики для человеческого IgG1 дикого типа, для SCID-мышей. Рассчитанные уровни клиренса для всех вариантов антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа и к человеческому CD3 IgG1-изотипа оказались сходными с их аналогами дикого типа (фиг. 11B; день 21  
5 после инъекции). Различия между группами главным образом отражали различия на фазе распределения, которые могли обуславливаться различием в гликозилировании между партиями, и они могут не зависеть от формата. Величина  $t_{1/2}$ -бета, по-видимому, является сопоставимой при всех мутациях.

В целом, интродукция неактивирующих мутаций, включая новые мутации  
10 L234F-L235E-G236R, не влияла на фармакокинетику вариантов антител IgG1-изотипа у мышей.

Пример 13: Оценка иммуногенности вариантов антител, несущих неактивирующие мутации L234F-L235A-G236R в Fc-области

Риск иммуногенности в клинических условиях константного домена  
15 варианта антитела IgG1-изотипа, несущего мутации L234F-L235E-G236 (IgG1-FER), оценивали с помощью технологий компьютерного моделирования (*in silico*) фирмы Abzena iTore™ и TCED™.

Программное обеспечение iTore™ прогнозирует предпочтительные взаимодействия между аминокислотами боковых цепей всех возможных 9-  
20 мерных пептидов в тестируемой белковой последовательности и открытых связывающих бороздок 34 аллелей человеческого МНС класса II (Perry и др., Drugs RD 9(6), 2008, сс. 385–396). Выбранные аллели представляли собой наиболее часто встречающиеся аллели HLA-DR, обнаруженные в мире, без учета тех, которые были наиболее распространены в какой-либо конкретной  
25 этнической популяции. Путем сравнения указанных прогнозов касательно связывающих последовательностей МНС класса II, присутствующих в эталонном человеческом IgG1(m)f дикого типа, можно идентифицировать новые связывающие последовательности. Пептиды, которые согласно прогнозу должны связываться с умеренной и высокой аффинностью с  $\geq 50\%$  аллелей МНС класса  
30 II, вероятно, коррелируют с присутствием Т-клеточных эпитопов (Hill и др., Arthritis Res Ther 5(1), 2003, сс. R40–8). TCED™ представляет собой базу данных известных Т-клеточных эпитопов, идентифицированных в исследованиях иммуногенности *ex vivo* с использованием различных белков,

преимущественно антител (Bryson и др., BioDrugs 24(1), 2010, сс. 1–8). База данных опрашивается с помощью BLAST-поиска для подтверждения, присутствуют ли в базе данных также пептиды с прогнозируемой произвольной умеренной или высокой аффинностью.

5            Каждый 9-мер оценивали на основе потенциальной "пригодности" и взаимодействий с молекулами МНС класса II. Баллы для пептида, рассчитанные с помощью программного обеспечения, находились в пределах между 0 и 1. Пептиды, для которых обнаружен высокий усредненный балл связывания ( $>0,55$  в функции подсчета баллов iTope™), выделяли и, если  $\geq 50\%$  пептидов, связывающихся с МНС класса II (т.е. 17 из 34 аллелей), обладали высокой аффинностью связывания (балл  $>0,6$ ), то такие пептиды рассматривали как связывающиеся с МНС класса II с "произвольной высокой аффинностью" пептиды, которые имеют высокий риск содержания CD4<sup>+</sup> Т-клеточных эпитопов. Связывающиеся с МНС класса II с произвольной умеренной аффинностью пептиды связывают  $\geq 50\%$  аллелей с баллом связывания  $>0,55$  (но без большинства  $>0,6$ ). Дополнительный анализ последовательностей осуществляли с помощью TCED™. Указанные критерии изменяли в случае крупной ароматической аминокислоты (т.е. F, W, Y), встречающейся в положении якоря p1, в котором открытый карман p1 у 20 из 34 аллелей позволяет связывать крупный ароматический остаток. Если это имело место, то произвольный пептид рассматривали как связывающийся с 10 или большим количеством аллелей из подгруппы, состоящей из 20 аллелей. Последовательности применяли для опроса TCED™ с помощью BLAST-поиска для идентификации любой высокой гомологии последовательности между пептидами (Т-клеточные эпитопы) из неродственных белков/антител, которые стимулировали Т-клеточные ответы в проведенных ранее исследованиях *ex vivo*.

          Анализ iTope™ не позволил идентифицировать ни одной последовательности, связывающейся с МНС класса II с произвольной умеренной или высокой аффинностью, из последовательностей, присутствующих в IgG1-FER, и отсутствующих в IgG1(m)f дикого типа. Таким образом, основываясь на этом анализе, не обнаружен очевидный повышенный риск клинической иммуногенности для антител, основой которых является IgG1-FER.

Пример 14: Глико-анализ неактивирующих вариантов антител

Молекулы IgG имеют один консервативный связанный с Asn (N) сайт гликозилирования в CH2-участке (положение N297 в случае IgG1). Ядерная структура указанного связанного с Asn гликана состоит N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) и остатков маннозы. Дальнейшее удлинение может происходить с помощью галактозы, сиаловой кислоты, ядерного фукозилирования и бисекционирующего GlcNAc (Vidarsson и др., *Front. Immunology* 5, 20 октября 2014 г., с. 520), что приводит к образованию молекул IgG1 с гетерогенным гликозилированием на N297. Гликаны играют важную роль в конформации, стабильности и биологической функции белков (Costa и др., *Crit Rev Biotechnol* 34(4), 2014, сс. 281-299). Таким образом, изменения гликозилирования в молекулах IgG1 являются нежелательными, поскольку могут влиять на эффективность и фармакокинетические свойства. Кроме того, гетерогенность гликанов необходимо анализировать и контролировать в процессе производства, а заряженные гликаны могут дополнительно усложнять трудоемкость аналитических анализов на основе заряда, таких как капиллярное изоэлектрическое фокусирование изображений (iCIEF), которые применяют для тестирования высвобождения или определения характеристик.

В данном примере осуществляли профилирование N-связанных гликанов антитела дикого типа к человеческому CD20 IgG1-изотипа и его неактивирующих вариантов, которые несут мутации L234F-L235E-D265A или L234F-L235E-G236R в дополнение к мутации K409R. Кроме того, осуществляли профилирование гликанов антитела к человеческому CD3 (huCLB-T3/4) IgG1-изотипа, несущего мутации L234F-L235E-F405L, или его вариантов, дополнительно содержащих мутацию D265A или G236R.

Оценку N-связанного гликозилирования в IgG1 осуществляли двумя различными указанными методами (таблица 2). IgG1 к человеческому CD20 дикого типа, IgG1 к человеческому CD20, несущий мутации L234F-L235E-D265A-K409R, и варианты IgG1 к человеческому CD3, несущие мутацию либо L234F-L235E-F405L, либо L234F-L235E-D265A-F405L, анализировали путем меченя 2-аминобензамидом (2-AB). Профилирование N-связанных гликанов осуществляли с помощью ЖХВР-анализа с нормальной фазой, используя модуль разделения Waters Alliance 2695 (фирма Waters), для меченных 2-AB гликанов.

N-связанные гликаны высвобождали из антител путем инкубации с пептид-N-гликозидазой F (каталожный № GKE-5006D, фирма PROzyme). Затем антитела осаждали этанолом (охлаждение на льду) и удаляли. Супернатанты, содержащие высвободившиеся гликаны, сушили в вакууме. Полученные гликаны  
5 солюбилизировали и затем метили с помощью 2-AB-флуорофорной метки (из набора для мечения гликанов LudgerTag 2-AB, каталожный № LT-KAB-A2, фирма Ludger) на подлежащем восстановлению конце путем восстановительного аминирования для ЖХВР-анализа. Затем получали ЖХВР-профили с использованием градиентного элюирования в сочетании с детекцией  
10 флуоресценции. Интегрированные интенсивности ЖХВР-пиков использовали в качестве показателя для определения процентных значений молярного содержания индивидуальных N-связанных гликанов (например, G0F, G1F, G2F и т.д.) относительно всей популяции олигосахаридов. Пики оценивали на основе стандартной смеси внешних гликанов (приготовленной путем смешивания  
15 отдельных гликанов фирмы Ludger: NGA2 (=G0, № CN-NGA2-20U), NGA2F (=G0F, CN-NGA2F-20U), NA2 (=G2, № CN-NA2-20U), NA2F (=G2F, № CN-NA2F-20U), MAN5 (№ CN-MAN5-20U), MAN6 (№ CN-MAN6-20U), MAN8 (№ CN-MAN8-20U), MAN9 (№ CN-MAN9-20U), A1 (№ CN-A1-20U), A1F (№ CN-A1F-20U), A2 (№ CN-A2-20U), A2F (№ CN-A2F-20U).

20 Вариант IgG1 к человеческому CD20, несущий мутации L234F-L235E-G236R в дополнение к K409R, и вариант IgG1 к человеческому CD3, несущий мутации L234F-L235E-G236R в дополнение к F405L, анализировали с помощью жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС), используя для анализа масс-спектрометр Orbitrap Q-Exactive Plus (фирма Thermo Fischer).  
25 Идентификацию и количественное определение N-связанного гликозилирования осуществляли на восстановленной гликозилированной тяжелой цепи антитела. Учитывая известную первичную аминокислотную последовательность тяжелой цепи, можно идентифицировать массовые характеристики присоединенных N-связанных гликанов. В целом, метод состоял в следующем: образцы антител  
30 разводили до концентрации 200 мкг/мл в ЗФР, рН 7,4 (каталожный № 3623140, фирма В. Braun) до общего объема 50 мкл. Затем добавляли 1 мкл 1М дитиотреитола (DTT; каталожный № D9163, фирма Sigma) к 50 мкл образца и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После этого образец переносили в

стеклянный флакон Qsert (каталожный № 186001128с, фирма Waters) и применяли для ЖХ-МС. 1 мкл инъецировали в колонку для ЖХ и антители элюировали, используя градиент подвижной фазы А (вода Milli-Q с 0,1%-ной муравьиной кислотой, каталожный № 56302-50ml-F, фирма Fluka) – подвижной фазы Б (0,1%-ная муравьиная кислота в ацетонитриле, каталожный № 0001934101BS, фирма Bio Solve) от 23% (Б) до 95% (Б) в течение 2 мин при скорости потока 0,2 мл/мин. Полученные необработанные m/z-спектры подвергали деконволюции с помощью программного обеспечения Protein Deconvolution 4.0 (фирма Thermo Fisher). В результате подвергнутые деконволюции спектры свидетельствовали об уменьшении масс гликозилированных тяжелых цепей. Полученные интенсивности пиков (после спектральной деконволюции) использовали в качестве показателя для определения процентных значений молярного содержания индивидуальных N-связанных гликанов (например, G0F, G1F, G2F и т.д.) относительно всей популяции олигосахаридов. На фиг. 12 показаны схематические изображения обнаруженных видов гликанов.

Сведения об относительном содержании различных олигосахаридов в сочетании со сведениями об их структуре (см. фиг. 12) позволяли рассчитывать общий уровень галактозилирования и количество заряженных гликанов относительно их количеств в A2F-структуре. Рассчитанные таким образом количества в виде процентов представляют собой молярные количества, т.е. представляют собой количество молекул, а не их массу. Исходя из представленных в таблице 2 данных, рассчитано, что последовательность IgG1 дикого типа имеет процентное содержание заряженных гликанов и процент галактозилирования на уровне между 0-1% и 15-25% соответственно. Процент заряженных гликанов и галактозилирования вариантов с неактивирующими мутациями L234F-L235E-D265A составлял примерно 10% и примерно 60%.

Оценка гликозилирования (таблица 2) вариантов антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа продемонстрировала, что интродукция неактивирующих мутаций L234F-L235E-D265A в комбинации с мутацией K409R повышала галактозилирование, определенное на основе G1 или G2 и их вариантов (G: галактоза), и повышала процент заряженных гликанов, определенных на основе A1 или A2 и их вариантов (A: сиаловая кислота), по сравнению с антителом к

человеческому CD20 дикого типа IgG1-изотипа. Аналогичная схема обнаружена для варианта антитела к человеческому CD3 IgG1-изотипа, несущего неактивирующие мутации L234F-L235E-D265A в дополнение к мутации F405L. Повышенное галактозилирование и процент заряженных гликанов могут быть связаны с присутствием мутации D265A, поскольку вариант антитела к человеческому CD3 IgG1-изотипа, несущий мутации L234F-L235E-F405L, имел схемы гликозилирования, сходные с антителом к человеческому CD20 IgG1-изотипа. В соответствии с указанным интродукция неактивирующих мутаций L234F-L235E-G236R либо в IgG1-K409R к человеческому CD20, либо в IgG1-F405L к человеческому CD3 также не приводила к повышенному галактозилированию и повышенному присутствию заряженных гликанов.

В целом, в то время как интродукция неактивирующих мутаций L234F-L235E-D265A в константную область тяжелой цепи антител IgG1-изотипа повышала гетерогенность гликозилирования антител с повышением уровня галактозилирования и повышением присутствия заряженных гликанов, интродукция неактивирующих мутаций L234F-L235E-G236R в антитела IgG1-изотипа обеспечивала сохранение профиля гликанов, который оставался сопоставимым с профилем, характерным для константной области IgG1 дикого типа.

Таблица 2

		Виды гликанов <sup>1</sup> (%)																		
Вариант	G0	G0F	G0F-GN	Man5	G1	G1F	G1F-GN	G2/Man6	G2	Man6	G2F	A1	A1F	Man7	Man8	A2	A2F/Man9	A2F	Man9	
IgG1-CD20	FEA-K409R <sup>2</sup>	0,6	12,2	na	1,2	0,0	36,3	na	0,7	na	Na	24,7	4,5	7,5	na	0,5	3,4	0,8	na	na
	WT <sup>2</sup>	4,5	61,4	na	2,9	1,2	24,2	na	0,8	na	Na	2,4	0,6	0,2	na	0,2	na	na	na	na
	FER-K409R <sup>3</sup>	0,0	58,1	6,1	3,6	0,0	25,3	4,2	na	0,0	0,0	2,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	na	0,0	0,0
IgG1-CD3	FEA-F405L <sup>2</sup>	0,3	13,2	na	0,9	0,0	36,8	na	0,6	na	Na	25,1	5,8	8,3	na	0,5	3,1	1,0	na	na
	FE-F405L <sup>2</sup>	1,5	53,7	na	1,6	0,4	34,5	na	0,5	na	Na	5,6	0,5	0,3	na	0,0	<0, 1	0,0	na	na
	FER-F405L <sup>3</sup>	0,0	57,3	6,2	2,9	0,0	26,1	3,2	na	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	2,2	0,0	0,0	na	0,0	0,0

<sup>1</sup> Схематические изображения видов гликанов представлено на фиг. 12

<sup>2</sup> Проанализировано на основе мечения с помощью 2-AB. G2, Man6, A2F, Man9 не удается разделить (неприменимо, na), представлены данные о сумме обеих пар. G0F-GN, G1F-GN и Man7 не оценивали с помощью этого метода (неприменимо; na)

5

<sup>3</sup> Анализ с использованием масс-спектрометрии с помощью устройства Orbitrap. G2, Man6, A2F и Man9 выявляли по отдельности. Суммы: G2/Man6 и A2F/Man9 неприемлемо (na)

В таблице 2 представлены результаты анализа гликозилирования вариантов антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа и к человеческому CD3 IgG1-изотипа, несущих неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи. IgG1 к человеческому CD20 дикого типа (wt) или его вариант с мутациями L234F-L235E-D265A-K409R, а также IgG1 к человеческому CD3, несущий мутации L234F-L235E-F405L или L234F-L235E-D265A-F405L, анализировали методом на основе 2-AB-мечения. Профили гликанов в вариантах антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа и к человеческому CD3 IgG1-изотипа, несущих мутации L234F-L235E-G236R-K409R или L234F-L235E-G236R-F405L соответственно, оценивали с помощью жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС). В отличие от метода ЖХ-МС Orbitrap метод на основе 2-AB-мечения не позволяет отличать друг от друга G2 и маннозу 6, а также A2F и маннозу 9 (неприменимо; na) и поэтому представлена сумма обоих компонентов. G0F-GN, G1F-GN и Man7 не поддавались оценке 2-AB-методом, что обозначено как "неприменимо" (na). Протестированные варианты представляли собой IgG1, IgG1-FER-K409R, IgG1-FEA-K409R, IgG1-FE-F405L, IgG1-FER-F405L, IgG1-FEA-F405L где FER: L234F-L235A-G236R, FE: L234F-L235E и FEA: L234F-L235E-D265A. Схематические изображения обнаруженных видов гликанов представлены на фиг. 12.

Пример 15: Эффективность контролируемого обмена Fab-плечей для создания неактивирующих вариантов антител

Для определенных вариантов применения, таких как опосредуемая Т-клетками цитотоксичность в отношении клеток-мишеней, что продемонстрировано в примере 11, требуется создание и применение вариантов биспецифических антител (bsAb), в которых одно F(ab)-плечо может взаимодействовать с мишенью А, и другое F(ab)-плечо взаимодействовать с мишенью Б.

При создании изобретения оценивали эффективность создания вариантов bsAb с помощью контролируемого обмена Fab-плечей (сFAE), описанного в примере 1, после интродукции неактивирующих мутаций в константную область тяжелой цепи родительских моноспецифических антител в дополнение к любой из мутаций F405L или K409R, каждая из которых присутствует в одном из моноспецифических антител, требуемых для эффективного образования

гетеродимера. В целом, метод состоял в следующем: антитела смешивали в эквимольной концентрации и инкубировали с 75мМ 2-меркаптоэтиламином-HCl (2-МЕА; каталожный № 30078, фирма Sigma Aldrich) при 31°C в течение 5 ч. Затем осуществляли замену буфера на 3ФР согласно методу, описанному в примере 1, и концентрацию измеряли по абсорбции при 280 нм, используя спектрофотометр NanoDrop ND-2000-EU (фирма Thermo Fisher). Осуществляли масс-спектрометрический анализ для обнаружения содержания биспецифических конструкций и оставшихся гомодимеров с помощью масс-спектрометра Orbitrap Q-Exactive Plus (фирма Thermo Fischer).

10 Оценка эффективности сFAE показала, что интродукция неактивирующих мутаций L234F-L235E-G236R в дополнение к мутации F405L или K409R, каждая из которых присутствовала в одном из моноспецифических антител, приводила к эффективному сFAE, при этом по меньшей мере 95% популяции представляли собой IgG1-bsAt (BisG1), а оставшиеся популяции представляли собой одно или  
15 оба моноспецифических антитела (обозначены на чертеже как IgG1-A и IgG1-B); фиг. 13А). Кроме того, оценивали эффективность сFAE при создании вариантов bsAt с асимметричным распределением неактивирующих мутаций, т.е. L234F-L235E-G236R присутствовали в одном варианте моноспецифического антитела в дополнение к мутации F405L или K409R, а L234F-L235E-D265A  
20 присутствовали в другом варианте моноспецифического антитела в дополнение к мутациям F405L или K409R. Анализ продемонстрировал сходную эффективность создания вариантов bsAt (фиг. 13Б, В), что показано для вариантов, несущих неактивирующие мутации L234F-L235E-G236R в обоих плечах bsAt, в дополнение к мутации F405L или K409R, каждая из которых  
25 присутствовала в одном из моноспецифических антител (фиг. 13А).

В целом, варианты антител, несущие новые неактивирующие мутации L234F-L235E-G236R в константной области тяжелой цепи IgG1, сохраняли способность эффективно образовывать варианты bsAt с помощью контролируемого обмена Fab-плечей с использованием мутаций F405L и K409R,  
30 каждая из которых присутствовала в одном из моноспецифических антител, позволяя осуществлять гетеродимеризацию и предупреждать образование моноспецифических гомодимеров.

Пример 16: Уровни производства неактивирующих вариантов антител

В этом примере оценивали уровни производства вариантов антител, несущих неактивирующие мутации либо L234F-L235E-G236R, либо L234F-L235E-D265A в константной области тяжелой цепи в дополнение к любой из мутаций F405L или K409R.

Все варианты антител получали в клетках Expi293F согласно методу, описанному в примере 1. Во избежание различий в титрах продукта из-за применения конкретных клонов для одного варианта неактивирующего антитела, отличных от другого, и для возможности непосредственного сравнения титра продукта, представляющего собой варианты антител, несущие неактивирующие мутации либо L234F-L235E-D265A, либо L234F-L235E-G236R в константной области тяжелой цепи, одни и те же клоны антител применяли в каждой группе, т.е. варианты антител с мутацией F405L или варианты антител с мутацией K409R.

Анализ уровней производства продемонстрировал, что уровни производства неактивирующих вариантов антител, несущих мутации L234F-L235E-G236R в дополнение к мутации F405L (закрашенные кружки), были сходными с уровнями вариантов антител, несущих неактивирующие мутации L234F-L235E-D265A в дополнение к мутации F405L (незакрашенные кружки; фиг. 14). Хотя уровни производства вариантов антител, несущих неактивирующие мутации L234F-L235E-G236R в дополнение к мутации K409R (закрашенные квадраты), были сходными с уровнями вариантов антител, которые включали мутацию F405L в дополнение к неактивирующим мутациям, небольшое повышение средних уровней производства обнаружено для вариантов антител, несущих неактивирующие мутации L234F-L235E-D265A в дополнение к мутации K409R (незакрашенные квадраты; фиг. 14).

В целом, не обнаружено существенных различий в уровнях производства неактивирующих вариантов антител, несущих мутации L234F-L235E-G236R в дополнение к любой из мутаций F405L или K409R, по сравнению с вариантами, несущими неактивирующие мутации L234F-L235E-D265A в дополнение к мутации F405L или K409R.

Пример 17: Оценка стабильности и растворимости неактивирующих вариантов антител IgG1-изотипа с помощью анализов средней точки ПЭГ, DLS и DSF

5 Характеристики стабильности и растворимости белка вариантов антител к CD20 и к CD3 IgG1-изотипа, несущих неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, оценивали с помощью анализов индуцированного ПЭГ осаждения, дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF) и динамического рассеяния света (DLS).

10 Образцы вариантов антител к человеческому CD20 и человеческому CD3 (huCLB-T3/4) IgG1 приготавливали в ЗФР, pH 7,4 в концентрации приблизительно 20 мг/мл (диапазон концентраций 18,7 - 21,6 мг/мл; для вариантов антител к человеческому CD3 IgG1-изотипа применяли фильтрацию). ЗФР применяли в качестве не являющегося оптимальным наполнителя, позволяющегося надежнее осуществлять сравнение стабильности  
15 белков.

Для оценки конформационной стабильности белка осуществляли DSF с использованием системы детекции ПЦР в реальном времени (iQ5 Multicolor Real-Time PCR detection system) (фирма Bio-Rad), которая позволяет выявлять изменения в интенсивности флуоресценции, вызванные связыванием внешнего  
20 красителя Sypro-Orange (5000×-кратный концентрат в ДМСО, каталожный № S5692, фирма Sigma-Aldrich) с гидрофобными областями, экспонированными денатурированным IgG. Sypro-Orange разводили в 320 раз в ЗФР (фирма Nunc GE Healthcare, каталожный № SH3A383.03) с pH 7,4 или в 30мМ ацетате натрия с pH 4 (каталожный № 25022-1KG-R, фирма Sigma-Aldrich) до концентрации  
25 75мМ. Кривую термического расплавления можно получать путем измерения возрастающей флуоресценции во время контролируемой ступенчатой термической денатурации анализируемого IgG. Для этой цели образцы объемом 5 мкл (разведенные в ЗФР; диапазон концентраций 1 мг/мл ± 10%) вариантов антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа, несущих либо мутацию K409R,  
30 либо мутации L234F-L235E-D265A-K409R, либо L234F-L235E-G236R-K409R, или вариантов антител к человеческому CD3 IgG1-изотипа, несущих либо мутацию F405L, либо мутации L234F-L235E-D265A-F405L, либо L234F-L235E-G236R-F405L, смешанные с 20 мкл 75мМ Sypro-Orange (либо в ЗФР с pH 7,4,

либо 30мМ ацетате натрия с рН 4), приготавливали с дублированием в 96-луночных планшетах для ПЦР iCycler iQ. Флуоресценцию во всех лунках (длина волны возбуждения 485 нм, длина волны испускания 575 нм) регистрировали при повышении температуры в диапазоне от 25°C до 95°C, поэтапно с шагом 0,5°C на шаг и продолжительностью 15 с плюс время, необходимое для регистрации флуоресценции. Данные анализировали с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager Software 3.0, и точки плавления определяли из графиков зависимости флуоресценции от температуры с помощью указанной программы.

10 DLS-анализ осуществляли для оценки склонности указанных выше вариантов антител к агрегации в растворе, измеренной по коллоидной стабильности. 20 мкл вышеуказанных вариантов антител (диапазон концентраций 1 мг/мл  $\pm$  10%) в ЗФР с рН 7,4, анализировали с использованием планшет-ридера типа II DynaPro (фирма Wyatt Technology) с помощью  
15 программного обеспечения Dynamics 7. Образцы вносили в трех повторностях в круглодонные 384-луночные планшеты IQ-LV (фирма Aurora Biotechnologies, каталожный № 1011-00110), центрифугировали в течение 3 мин при 2111  $\times$  g и покрывали парафиновым маслом. Перед осуществлением измерений планшеты вновь центрифугировали в течение 3 мин при 2111  $\times$  g. Измерения методом  
20 теплового сканирования проводили при постоянно повышающейся температуре (увеличение на 1°C/экспериментальную точку для каждого конкретного образца) на протяжении всего эксперимента. Для анализа данных использовали процедуру кумулятивной подгонки, в результате которой определяли кажущийся радиус. Применяли отсекающее значение 2,1 нм, что позволяло исключать пики с меньшим радиусом, которые часто вызваны связанными с программой  
25 дефектами и которые не всегда были обнаружены при каждом сборе данных. Показатель преломления 1,333 и вязкость 1,019 сП использовали для ЗФР - буфера при 25°C (стандартные значения представлены в программном  
обеспечении Dynamics). Данные обрабатывали с помощью Microsoft Excel для  
30 определения начала агрегации ( $T_{agg}$ ).  $T_{agg}$  определяли путем вычисления среднего значения и стандартного отклонения ( $n=10$ , первые 10 измерений) радиуса для каждой лунки. Установив доверительный интервал 99,99% для каждого измерения по отдельности, первое последовательное значение (начиная

с 25°C до 80°C), которое выходило за пределы доверительного интервала, рассматривали в качестве  $T_{agg}$ . Осуществляли пять последовательных измерений в трех повторностях в каждом эксперименте.

Осуществляли анализ индуцированного ПЭГ осаждения для оценки относительной растворимости белка. Приготавливали два буфера; буфер А: 50мМ фосфатный буфер, рН 7,0 (одноосновный фосфат натрия; фирма Fluka, каталожный № 17844 + двухосновный дигидрат фосфата натрия, фирма Fluka, каталожный № 71633); буфер Б: 50мМ фосфатный буфер, рН 7,0 + 40% (мас./об.) ПЭГ8000 (фирма Sigma-Aldrich, каталожный № P5413). Различные количества буфера Б смешивали с буфером А с получением серии из 11 различных концентраций ПЭГ, в диапазоне от 0% до 40% ПЭГ. Аликвоты (80 мкл) каждой концентрации буфера с ПЭГ добавляли в различные лунки 96-луночного планшета (96-луночный планшет UV Star® 96, половина площади, фирма Greiner Bio-one, каталожный № 675801). Образец каждого антитела (разведенный до 1 мг/мл в ЗФР) объемом 20 мкл добавляли в лунки, содержащие серии включающего ПЭГ буфера. Планшеты накрывали герметиком и встряхивали в течение 5 мин при 750 об/мин. Планшет выдерживали в течение ночи при КТ и затем встряхивали в течение 5 мин. Затем планшет центрифугировали в течение 20 мин при 4000 об/мин для удаления осажденного антитела. Из каждой лунки по 80 мкл осторожно переносили в новый 96-луночный планшет UV Star, не нарушая полученный после центрифугирования осадок. Измеряли абсорбцию при 280 нм ( $A_{280}$ , коррелирующую с количеством солюбилизированного белка) с помощью многофункционального ридера для микропланшетов Synergy™ 2 (фирма Biotek Instruments, BioSPX) и пересчитывали на объем 100 мкл (коррекция на длину пути) и вычитали "пустые" значения (ПЭГ без антитела). Строили график зависимости скорректированных величин  $A_{280}$  от концентрации ПЭГ с помощью Graphpad Prism 8. Данные анализировали, используя нелинейную регрессию, при этом средняя точка ПЭГ (%) отражает концентрацию тестируемого образца, при которой осаждалось 50% антитела (т.е. 50%-ная потеря при  $A_{280}$  по сравнению с 0% ПЭГ). Среднюю точку ПЭГ применяли в качестве показателя растворимости, более высокая точка ПЭГ соответствует лучшей растворимости.

Результаты описанных выше анализов обобщены в таблицах 3 и 4. DSF-анализ позволил определить температуру плавления ( $T_m$ ), составляющую  $68,0^{\circ}\text{C}$  при pH 7,4, которая снижалась до  $T_{m1}$ , составляющей  $56,0^{\circ}\text{C}$  и  $T_{m2}$ , составляющей  $62,0^{\circ}\text{C}$ , при pH 4,0.  $T_m$ , установленную для антитела к

5 человеческому CD20 IgG1-L234F-L235E-G236R-K409R при pH 7,4, сравнивали с температурой плавления содержащего K409R варианта ( $67,8^{\circ}\text{C}$  против  $68,0^{\circ}\text{C}$  соответственно). При pH 4,0, для варианта, несущего мутации L234F-L235E-G236R-K409R, обнаружена одна  $T_m$   $58,0^{\circ}\text{C}$ . В противоположность этому, вариант IgG1 к человеческому CD20, несущий мутации L234F-L235E-D265A-

10 K409R, имел пониженную  $T_{m1}$ , составляющую  $63,3^{\circ}\text{C}$ , и  $T_{m2}$ , составляющую  $68,5^{\circ}\text{C}$ , при 7,4, в то время как при pH 4,0 зарегистрированы три  $T_m$ , а именно,  $48,5^{\circ}\text{C}$ ,  $57,0^{\circ}\text{C}$  и  $61,0^{\circ}\text{C}$ . В случае антитела к человеческому CD3 IgG1-изотипа варианты, несущие либо только мутацию F405L, либо мутации L234F-L235E-G236R-F405L, имели одинаковую  $T_m$  при pH 7,4 ( $68,0^{\circ}\text{C}$ ) и весьма сходные  $T_{m1}$  и

15  $T_{m2}$  при pH 4,0 (F405L:  $53,5$  и  $70,5^{\circ}\text{C}$ ; L234F-L235E-G236R-F405L:  $54,5$  и  $70,8^{\circ}\text{C}$ ). При pH 7,4  $T_m$  варианта антитела IgG1-huCLB-T3/4-L234F-L235E-D265A-F405L оказалась более низкой ( $63,0^{\circ}\text{C}$ ) по сравнению с содержащими F405L и L234F-L235E-G236R-F405L вариантами. Кроме того, при pH 4,0, первая зарегистрированная  $T_m$  для варианта IgG1-huCLB-T3/4-L234F-L235E-D265A-

20 F405L оказалась более низкой ( $48,5^{\circ}\text{C}$ ) по сравнению с другими вариантами IgG1-huCLB-T3/4, в то время как для IgG1-huCLB-T3/4-L234F-L235E-D265A-F405L установлена вторая  $T_m$ , составляющая  $71,0^{\circ}\text{C}$ , что согласуется с температурой для других вариантов IgG1-huCLB-T3/4.

Для вариантов антител к человеческому CD20 IgG1-K409R и к

25 человеческому CD20 IgG1-L234F-L235E-D265A-K409R обнаружена самая низкая температура агрегации ( $T_{agg}$ ;  $57,9^{\circ}\text{C}$  и  $58,5^{\circ}\text{C}$  соответственно), далее в порядке увеличения температуры следовал вариант, содержащий L234F-L235E-G236R-K409R ( $59,9^{\circ}\text{C}$ ). Среди вариантов IgG1-huCLB-T3/4 самая низкая  $T_{agg}$  обнаружена для варианта, несущего мутации L234F-L235E-D265A-F405L

30 ( $58,7^{\circ}\text{C}$ ), далее в порядке увеличения температуры следовали варианты, содержащие F405L и L234F-L235E-G236R-F405L ( $61,7^{\circ}\text{C}$  и  $62,0^{\circ}\text{C}$  соответственно).

Для вариантов антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа, несущих либо мутацию K409R, либо мутации L234F-L235E-D265A-K409R, либо мутации L234F-L235E-G236R-K409R, установлен сопоставимый относительный профиль растворимости, что продемонстрировано с помощью анализа индуцированного ПЭГ осаждения. В целом, для вариантов IgG1 к человеческому CD3 продемонстрирована более низкая относительная растворимость по сравнению с вариантами IgG1 к человеческому CD20. Варианты IgG1 к человеческому CD3, несущие мутации L234F-L235E-D265A-F405L или L234F-L235E-G236R-F405L, оказались сопоставимыми с позиции растворимости. Оба этих варианта оказались относительно несколько менее растворимыми, чем вариант IgG1-F405L к человеческому CD3.

В целом, установлено, что варианты антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа, несущие неактивирующие мутации, имели сопоставимый профиль с позиции растворимости и склонности в агрегации по сравнению с содержащим K409R контрольным вариантом. Однако, хотя для вариантов, несущих мутации L234F-L235E-G236R-K409R, обнаружен профиль стабильности белков, сопоставимый с профилем содержащего K409R контрольного варианта, для вариант к человеческому CD20 IgG1-L234F-L235E-D265A-K409R продемонстрирован более низкий профиль стабильности белка. Среди вариантов IgG1 к человеческому CD3, варианты, несущие мутации F405L или L234F-L235E-G236R-F405L, обладали сопоставимыми склонностью к агрегации и профилем стабильности белков. Растворимость обоих неактивирующих вариантов оказалась пониженной по сравнению с содержащим F405L контрольным вариантом. Для варианта, несущего мутации L234F-L235E-D265A-F405L, продемонстрирована пониженная стабильность белка и несколько более высокая склонность к агрегации по сравнению с вариантами, несущими мутации F405L или L234F-L235E-G236R-F405L. Растворимость содержащего L234F-L235E-D265A-F405L варианта оказалась сопоставимой с растворимостью содержащего L234F-L235E-G236R-F405L варианта.

Таким образом, при приготовлении в высоких концентрациях в ЗФР для вариантов IgG1 к человеческому CD20 и CD3, несущих мутации L234F-L235E-G236R, продемонстрирован более надежный профиль стабильности белков, чем у содержащих L234F-L235E-D265A вариантов. Кроме того у вариантов IgG1 к

человеческому CD3, несущих мутации L234F-L235E-G236R, обнаружена несколько более низкая склонность к агрегации, чем у содержащих L234F-L235E-D265 вариантов.

5 В таблице 3 представлены данные о конформационной стабильности белков, полученные с помощью DSF-анализа, для вариантов антител IgG1-изотипа к человеческому CD20 и IgG1-изотипа к человеческому CD3 (huCLB-T3/4), несущих неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи. DSF: дифференциальная сканирующая флуориметрия (DSF); T<sub>m</sub>: температура плавления.

10 В таблице 4 представлены данные о растворимости белков, установленные с помощью анализа определения средней точки ПЭГ, и склонности к агрегации, определенные с помощью DLS-анализа для вариантов антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа и к человеческому CD3 IgG1-изотипа, несущих неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи. T<sub>agg</sub>: температура агрегации; ПЭГ: полиэтиленгликоль; DLS: динамическое рассеяние света.

Таблица 3

Вариант антитела		DSF <sup>1</sup>					
		3ФР, pH 7,4			Ацетат натрия, pH 4,0		
		T <sub>m1</sub> (°C)	T <sub>m2</sub> (°C)	T <sub>m3</sub> (°C)	T <sub>m1</sub> (°C)	T <sub>m2</sub> (°C)	T <sub>m3</sub> (°C)
IgG1-CD20 <sup>2</sup>	L234F-L235E-D265A-K409R	63,3	68,5	-	48,5	57,0	61,0
	K409R	68,0	-	-	56,0	62,0	-
	L234F-L235E-G236R-K409R	67,8	-	-	58,0	-	-
IgG1-CD3 <sup>2</sup>	L234F-L235E-D265A-F405L	63,0	72,0	-	48,5	71,0	-
	F405L	68,0	-	-	53,5	70,5	-
	L234F-L235E-G236R-F405L	68,0	-	-	54,5	70,8	-

<sup>1</sup> дифференциальная сканирующая флуориметрия

20 <sup>2</sup> концентрация IgG в анализе ~ 0,2 мг/м

Таблица 4

Вариант антитела		DLS <sup>1,2</sup>	ПЭГ <sup>3,4</sup>
		T <sub>agg</sub> (°C)	Средняя точка (%)
IgG1-CD20 <sup>3</sup>	L234F-L235E-D265A-K409R	58,5	19,4
	K409R	57,9	19,7
	L234F-L235E-G236R-	59,9	19,2

Вариант антитела		DLS <sup>1,2</sup>	ПЭГ <sup>3,4</sup>
		T <sub>agg</sub> (°C)	Средняя точка (%)
	K409R		
IgG1-CD3 <sup>3</sup>	L234F-L235E-D265A-F405L	58,7	11,0
	F405L	61,7	14,3
	L234F-L235E-G236R-F405L	62,0	12,0

<sup>1</sup> динамическое рассеяние света (DLS)

<sup>2</sup> концентрация IgG в анализе ~ 1 мг/мл

<sup>3</sup> полиэтиленгликоль

5 <sup>4</sup> концентрация IgG в анализе ~ 0,2 мг/мл

Пример 18: Влияние на стабильность белка неактивирующих вариантов антитела IgG1-изотипа после хранения при различных температурах в течение 1 или 4 месяцев

10 В примере 17 изучали стабильность и профиль растворимости белков вариантов антител к CD20 и CD3 IgG1-изотипа, несущих неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи. В настоящем примере стабильность белков указанных вариантов антител оценивали после хранения при 2-8°C или 40°C в течение 1 или 4 месяцев с использованием различных  
15 анализов.

Образцы вариантов антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа и к человеческому CD3 IgG1-изотипа (huCLB-T3/4) приготавливали в ЗФР с pH 7,4 в концентрации приблизительно 20 мг/мл (диапазон концентраций 18,7 - 21,6 мг/мл; для вариантов антител к человеческому CD3 IgG1-изотипа применяли  
20 фильтрацию). ЗФР применяли в качестве не являющегося оптимальным наполнителя, позволяющегося надежнее осуществлять сравнение стабильности белков. Варианты IgG1 к человеческому CD20, несли либо мутацию K409R, либо мутации L234F-L235E-D265A-K409R либо мутации L234F-L235E-G236R-K409R, в то время как варианты антител к человеческому CD3 IgG1-изотипа несли либо  
25 мутацию F405L, либо мутации L234F-L235E-D265A-F405L, либо мутации L234F-L235E-G236R-F405L. Образцы инкубировали в течение 1 месяца при 2-8°C, 1 месяца при 40 °C, 4 месяцев при 2-8°C, 4 месяцев при 40°C. Все образцы анализировали с помощью высокоэффективной гель-фильтрации (HP-SEC), капиллярного изоэлектрического фокусирования (cIEF), капиллярного

электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (КЭ-ДСН) и динамического рассеяния света (DLS).

5 HP-SEC-анализ осуществляли с использованием разделительного модуля Waters Alliance 2795 (фирма Waters), снабженного двойным детектором  $\lambda$ -абсорбции Waters 2487 (фирма Waters), с помощью TSK-колонки (G3000SWxl; фирма Tosoh Biosciences, каталожный № 6095006) и защитной колонки TSK-gel SWxl (фирма Tosoh Biosciences, каталожный № 6095007). Образцы (разведенные до 5 мг/мл в ЗФР с pH 7,4) пропускали со скоростью 1 мл/мин с использованием подвижной фазы, включающей 0,1М сульфат натрия ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фирма Sigma-  
10 Aldrich, каталожный № 31481)/0,1М фосфат натрия, pH 6,8 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , фирма Sigma-Aldrich, каталожный № 17844/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , фирма Sigma-Aldrich, каталожный № 71633). Результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения Empower 3 и для каждого пика выражали в виде процента от полной высоты пика.

15 cIEF-анализ осуществляли с использованием анализатора ICE3 (фирма ProteinSimple). Каждый вариант IgG1 к человеческому CD20 смешивали со смесью для анализа, которая содержала в конечном итоге 0,3 мг/мл антитела, 0,35% метилцеллюлозы (фирма ProteinSimple, каталожный № 101876); 2% фармалитов 3-10 (фирма GE Healthcare, каталожный № 17-0456-01); 6%  
20 фармалитов 8-10.5 (фирма GE Healthcare, каталожный № 17-0455-01); 0,5% маркера pI 7,65 и 0,5% маркера pI 10,10 (фирма ProteinSimple, каталожный № 102407 и каталожный № 102232 соответственно). Фокусирование осуществляли в течение 1 мин при 1500 В (предварительное фокусирование) и 7 мин при 3000 В. Варианты IgG1 к человеческому CD3 смешивали со смесью для анализа,  
25 которая содержала в конечном итоге 0,3 мг/мл антитела, 3,2М мочевины (фирма Sigma-Aldrich, каталожный №33247-1kg), 0,35% метилцеллюлозы; 2% фармалитов 3-10; 6% фармалитов 8-10,5; 0,5% маркера pI 7,65 и 0,5% маркера pI 10,10. Фокусирование осуществляли в течение 2 мин при 1500 В (предварительное фокусирование) и 9 мин при 3000 В. Изображение полного  
30 капиллярного поглощения получали с помощью устройства в виде камеры с зарядовой связью. После калибровки профилей пиков данные анализировали в отношении pI и площади (%) с помощью программного обеспечения Empower 3 (фирма Waters).

КЭ-ДСН осуществляли с использованием устройства LabChip® GXII Touch (фирма Perkin Elmer, каталожный № CLS138160) на чипе HT Protein Express LabChip (фирма Perkin Elmer, каталожный № 760499) с использованием набора HT Protein Express Reagent (фирма Perkin Elmer, каталожный № CLS960008) с несколькими модификациями. Образцы разводили до концентрации 1 мг/мл в 3ФР с рН 7,4, и образцы приготавливали путем смешения 2 мкл разведенного образца + 7 мкл денатурирующего раствора + 35 мкл MilliQ-воды. Образцы приготавливали в 96-луночных планшетах Bio-Rad HSP9601 (каталожный № 4TI-0960). Анализ осуществляли в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях (добавление DTT). Образцы денатурировали путем инкубации при 70°C в течение 3 мин. Чип подготавливали согласно инструкциям производителя и образцы антител подвергали анализу HT 200 с высокочувствительными настройками. Размер белков (кДа) и чистоту (%) анализировали с использованием программного обеспечения Labchip GXII, V5.3.2115.0.

Динамическое рассеяние света (DLS) осуществляли в целом согласно методу, описанном в пример 17, однако в данном исследовании DLS осуществляли при постоянной температуре 25°C для определения среднего размера частиц.

Все результаты обобщены в таблицах 5-7. Как установлено с помощью HP-SEC, хранение вариантов антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа и IgG1-huCLB-T3/4 при 2-8°C в течение 4 месяцев не влияло существенно на процент мультимеров, обнаруженных в образцах, по сравнению с 1-месячной экспозицией. Процент присутствующих мультимеров оказался самым высоким в образцах, содержащих варианты IgG1 к человеческому CD20 и CD3, которые выдерживали при 40°C в течение 4 месяцев, и более низким после хранения при 40°C в течение 1 месяца. Из хранившихся при 40°C образцов IgG1 к человеческому CD20 образцы вариантов, несущих мутации L234F-L235E-D265A-K409R, содержали более высокие проценты мультимеров, чем образцы вариантов, несущих мутации либо K409R, либо L234F-L235E-G236R-K409R. Кроме того, не обнаружено различий в процентах расщепления между образцами, содержащими варианты IgG1 к человеческому CD20. Среди вариантов антител к человеческому CD3 IgG1-изотипа повышенный процент мультимеров обнаружен в образцах, содержащих вариант L234F-L235E-G236R-

F405L, после хранения образцов при 40°C в течение 4 месяцев и в меньшей степени после хранения при 40°C в течение 1 месяца, хотя процент мультимеров оказался сопоставимым для образцов вариантов, несущих мутации L234F-L235E-D265A-F405L или F405L. После хранения варианта антитела к  
5 человеческому CD3 IgG1-L234F-L235E-G236R-F405L при в 40°C в течение 1 месяца относительно высокий процент белка оказался расщепленным, и это становилось еще более выраженным после 4-месячной экспозиции.

cIEF-анализ применяли для исследования изменения процентов кислых, нейтральных и основных пиков вариантов антител в ответ на различные  
10 стрессовые условия. Изменение процента кислого белка, присутствующего в образце, применяли в качестве суррогатного показателя дезамидирования. Следует отметить, что нейтральный пик расщеплялся на два пика в случае образцов, которые хранили в течение 1 месяца при любых температурах, которые суммировали в качестве процента нейтрального белка. Повышение  
15 процента кислого белка обнаружено во всех образцах в период между 1 и 4 месяцами хранения при 40°C, в то время как в образцах, которые хранили при 2-8°C, такое повышение процента кислого белка в период между 1 и 4 месяцами хранения не обнаружено. Проценты кислого белка оказались сопоставимыми во всех протестированных вариантах антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа.  
20 Для вариантов IgG1 к человеческому CD3, несущих либо только мутацию F405L, либо мутации L234F-L235E-D265A-F405L, либо мутации L234F-L235E-G236R-F405L мутации также обнаружены сопоставимые проценты кислых белков во всех изученных условиях, за исключением содержащего F405L варианта, в котором максимальное содержание кислых белков составляло 79% после 4  
25 месяцев хранения при 40°C, в то время как в вариантах, несущих неактивирующие мутации, достигало 98% и 96% в таких условиях соответственно.

Процент интактного белка, обнаруженного с помощью КЭ-ДСН, служил в качестве показателя целостности и расщепления белка в ответ на изученные  
30 стрессовые условия. Варианты IgG1 к человеческому CD20 в основном сохраняли их интактную структуру после хранения образцов при 2-8°C в течение 1 или 4 месяцев или хранения при 40°C в течение 1 месяца. Однако проценты обнаруженного интактного IgG снижались после выдерживания

образцов при 40°C в течение 4 месяцев во всех вариантах IgG1 к человеческому CD20, при этом наиболее сильное расщепление обнаружено в содержащем K409R варианте. Сходная, хотя менее выраженная, картина обнаружена при изучении процента HC и LC за исключением вариантов, несущих мутацию K409R или мутации L234F-L235E-D265A-K409R, в которых обнаружен близкий процент HC и LC. Для вариантов антител к человеческому CD3 IgG1-изотипа продемонстрирована сходная картина расщепления, при этом в содержащем L234F-L235E-G236R-F405L варианте обнаружен самый низкий процент интактного белка IgG1 после выдерживания при 40°C. Хотя проценты HC и LC в вариантах IgG1 к человеческому CD3 свидетельствовали о сходной в целом картине, самый низкий процент HC и LC обнаружен в варианте, несущем мутации L234F-L235E-D265A-F405L.

DLS-анализ осуществляли для определения среднего размера (радиуса) частиц после подвергания образцов вариантов антител указанным стрессовым условиям, что рассматривали в качестве суррогатного показателя уровня агрегации. В случае всех вариантов IgG1 к человеческому CD20 выдерживание образцов при 40°C в течение 4 месяцев существенно повышало средний радиус частиц по сравнению с другими изученными условиями. Самые большие средние радиусы частиц обнаружены для вариантов, несущих мутации L234F-L235E-G236R-K409R, по сравнению с вариантами, несущими K409R и L234F-L235E-D265A-K409R, во всех протестированных условиях. Частицы уже присутствовали в исходном продукте образца, содержащего вариант L234F-L235E-G236R-K409R. Касательно вариантов IgG1 к человеческому CD3, установлено, что частицы относительно крупного среднего размера обнаружены в IgG1-F405L-варианте к человеческому CD3 во всех протестированных условиях. Причина указанных больших радиусов, вероятно, не связана с применяемыми стрессовыми условиями, поскольку частицы уже присутствовали в исходном продукте. После стресса не выявлено повышение среднего размера частиц. Частицы существенно меньшего среднего размера обнаружены в вариантах, несущих неактивирующие мутации L234F-L235E-D265A-F405L или L234F-L235E-G236R-F405L.

В целом, инкубация при 40°C в течение 1-4 месяцев вариантов антител к человеческому CD20 и CD3 IgG1-изотипа, несущих неактивирующие мутации в

константной области тяжелой цепи, приводила к повышенной мультимеризации по сравнению с хранением вариантов при 2-8°C. Хотя более высокий уровень мультимеризации обнаружен для вариантов IgG1 к человеческому CD20, несущих мутации L234F-L235E-D265A-K409R, чем для вариантов, несущих мутации L234F-L235E-G236R-K409R, для вариантов IgG1 к человеческому CD3, несущих мутации L234F-L235E-G236R-F405L, обнаружен более высокий уровень мультимеризации по сравнению с вариантами, несущими мутации L234F-L235E-D265A-F405L. В целом, никакого увеличения процента кислого белка, применяемого в качестве суррогатного показателя дезамидированного белка, не обнаружено для любых протестированных вариантов антител, которые хранили при 2-8°C в течение 1 или 4 месяцев. Хотя образцы, которые хранили при 40°C в течение 1 месяца, содержали относительно большее количество кислого белка по сравнению с образцами, которые хранили при 2-8°C, дополнительное увеличение процента кислого белка выявлено для всех протестированных вариантов после хранения при 40°C в течение 4 месяцев. После хранения при 40°C меньшее содержание интактного белка обнаружено во всех вариантах антител, которое оказалось более выраженным после 4-месячного хранения. Для варианта антитела к человеческому CD3 IgG1-L234F-L235E-G236R-F405L обнаружено несколько более выраженное снижение процента интактного белка после хранения при 40°C в течение 4 месяцев. И, наконец, более значительная агрегация обнаружена для всех вариантов IgG1 к человеческому CD20 после хранения при 40°C в течение 4 месяцев. Среди вариантов IgG1 к человеческому CD3 оба варианта, которые несли неактивирующие мутации, содержали существенно меньшее количество агрегатов по сравнению с содержащим F405L вариантом.

Приемлемый профиль стабильности выявлен у обоих вариантов IgG1 к человеческому CD20 и CD3, несущих неактивирующие мутации либо L234F-L235E-D265A, либо L234F-L235E-G236R. Хранение при 40°C в течение 4 месяцев приводило к снижению профиля стабильности всех протестированных вариантов антител.

В таблице 5 представлены проценты мультимеров, мономеров и расщепленного белка по данным HP-SEC-анализа в образцах, содержащих варианты антител к человеческому CD20 и CD3 (huCLB-T3/4) IgG1-изотипа,

несущих неактивирующие мутации, или индивидуальную усиливающую гетеродимеризацию мутацию в константной области тяжелой цепи, которые хранили при 2-8°C или 40°C в течение 1 или 4 месяцев. HP-SEC: высокоэффективная гель-фильтрация.

5 В таблице 6 представлены проценты кислых, нейтральных и основных изоформ, присутствующих в образцах, которые содержали варианты IgG1 к человеческому CD20 и CD3, несущие неактивирующие мутации или индивидуальную усиливающую гетеродимеризацию мутацию в константной области тяжелой цепи, которые хранили при 2-8°C или 40°C в течение 1 или 4  
10 месяцев, по данным сIEF-анализа. Изменение процента кислой изоформы, присутствующей в образце, является суррогатным показателем уровня дезамидирования образца. CIEF: капиллярное изоэлектрическое фокусирование.

В таблице 7 представлены проценты интактного белка и сумма HC и LC по данным КЭ-ДСН-анализа в невосстанавливающих и восстанавливающих  
15 условиях, и средний радиус (в нм) частиц по данным DLS-анализа, обнаруженные в образцах, содержащих варианты IgG1 к человеческому CD20 и CD3, которые несли неактивирующие мутации или индивидуальную усиливающую гетеродимеризацию мутацию в константной области тяжелой цепи, которые хранили при 2-8°C или 40°C в течение 1 или 4 месяцев. КЭ-ДСН:  
20 капиллярный электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия; DLS: динамическое рассеяние света.

Таблица 5

Вариант антитела		Режим	HP-SEC		
			Мультимеры (%)	Мономеры (%)	Расщепление(%)
IgG1-CD20 <sup>1</sup>	L234F-L235E-D265A-K409R	1 мес. 2-8°C	1,1	98,6	0,3
		1 мес. 40°C	3,1	95,7	1,3
		4 мес. 2-8°C	1,3	98,3	0,3
		4 мес. 40°C	6,6	90,6	2,8
	K409R	1 мес. 2-8°C	1,2	98,4	0,4
		1 мес. 40°C	1,8	97,1	1,1
		4 мес. 2-8°C	1,1	98,5	0,4
		4 мес. 40°C	3,4	93,9	2,7
	L234F-L235E-G236R-K409R	1 мес. 2-8°C	0,7	99,3	0
		1 мес. 40°C	1,5	97,6	0,9
		4 мес. 2-8°C	0,7	99,3	0
		4 мес. 40°C	3,5	94	2,6
IgG1-CD3 <sup>1</sup>	L234F-L235E-D265A-F405L	1 мес. 2-8°C	0,3	99,5	0,2
		1 мес. 40°C	1,4	97,6	1,1
		4 мес. 2-8°C	0,2	99,7	0,1
		4 мес. 40°C	2	95,6	2,4

Вариант антитела	Режим	HP-SEC		
		Мультимеры (%)	Мономеры (%)	Расщепление(%)
F405L	1 мес. 2-8°C	0,3	99,5	0,2
	1 мес. 40°C	1,1	97,9	0,9
	4 мес. 2-8°C	0,1	99,9	0,1
	4 мес. 40°C	1,7	96	2,3
L234F-L235E-G236R-F405L	1 мес. 2-8°C	0,4	99,6	0
	1 мес. 40°C	2,7	87,6	9,7
	4 мес. 2-8°C	0,3	99,7	0
	4 мес. 40°C	3,6	81,4	15,3

<sup>1</sup> Тестирование в стрессовых условиях осуществляли IgG ~ 20 мг/мл

Таблица 6

Вариант антитела	Режим	сIEF			
		Кислые изоформы (%)	Нейтральные изоформы (%)	Основные изоформы (%)	
IgG1-CD20 <sup>1</sup>	L234F-L235E-D265A-K409R	1 мес. 2-8°C	49	48	3
		1 мес. 40°C	76	19	4
		4 мес. 2-8°C	47	49	4
		4 мес. 40°C	95	3	3
	K409R	1 мес. 2-8°C	39	54	7
		1 мес. 40°C	72	22	7
		4 мес. 2-8°C	41	51	9
		4 мес. 40°C	92	4	3
	L234F-L235E-G236R-K409R	1 мес. 2-8°C	20	76	4
		1 мес. 40°C	65	27	8
		4 мес. 2-8°C	17	80	4
		4 мес. 40°C	94	5	2
IgG1-CD3 <sup>1</sup>	L234F-L235E-D265A-F405L	1 мес. 2-8°C <sup>2</sup>	30	67	3
		1 мес. 40°C <sup>2</sup>	66	34	0
		4 мес. 2-8°C	30	67	3
		4 мес. 40°C	98	2	0
	F405L	1 мес. 2-8°C <sup>2</sup>	20	80	1
		1 мес. 40°C <sup>2</sup>	56	43	1
		4 мес. 2-8°C	23	73	5
		4 мес. 40°C	79	15	7
	L234F-L235E-G236R-F405L	1 мес. 2-8°C <sup>2</sup>	23	78	0
		1 мес. 40°C <sup>2</sup>	63	36	0
		4 мес. 2-8°C	22	74	5
		4 мес. 40°C	96	4	1

5

<sup>1</sup> Тестирование в стрессовых условиях осуществляли при концентрации IgG ~ 20 мг/мл

<sup>2</sup>Пик, соответствующий нейтральному белку, расщеплен из-за технической погрешности. % пиков обоих пиков просуммированы

Таблица 7

Вариант антитела	Режим	CE-SDS		DLS	
		Интактный IgG1 (%)	HC+LC (%)	Радиус (нм)	
IgG1-CD20 <sup>1</sup>	L234F-L235E-D265A-K409R	1 мес. 2-8°C	96	99	6,5
		1 мес. 40°C	с.и. <sup>2</sup>	96	7,6
		4 мес. 2-8°C	98	100	6,3
		4 мес. 40°C	66	89	21,6 <sup>3</sup>
	K409R	1 мес. 2-8°C	92	98	6,1
		1 мес. 40°C	82	96	6,5
		4 мес. 2-8°C	98	99	6,1
		4 мес. 40°C	57	90	41,5 <sup>3</sup>
	L234F-L235E-G236R-K409R	1 мес. 2-8°C	98	100	12,4 <sup>3</sup>
		1 мес. 40°C	89	98	27,0 <sup>3</sup>
		4 мес. 2-8°C	99	100	10,7 <sup>3</sup>
		4 мес. 40°C	67	92	74,5 <sup>3</sup>
IgG1-CD3 <sup>1</sup>	L234F-L235E-D265A-F405L	1 мес. 2-8°C	97	100	8,7
		1 мес. 40°C	92	97	9,1
		4 мес. 2-8°C	98	99	8,8
		4 мес. 40°C	78	91	9,3
	F405L	1 мес. 2-8°C	97	100	19,3 <sup>3</sup>
		1 мес. 40°C	93	99	22,1 <sup>3</sup>
		4 мес. 2-8°C	99	100	16,4 <sup>3</sup>
		4 мес. 40°C	80	95	18,0 <sup>3</sup>
	L234F-L235E-G236R-F405L	1 мес. 2-8°C	98	100	7,5
		1 мес. 40°C	86	97	7,4
		4 мес. 2-8°C	99	99	7,5
		4 мес. 40°C	69	93	7,6

<sup>1</sup> Тестирование в стрессовых условиях осуществляли при концентрации IgG ~ 20 мг/мл

<sup>2</sup> Интактный IgG с плечом

5 <sup>3</sup> Мульти-modalность: обнаружено несколько популяций с различными радиусами мес.: месяц(ы)

с.и.: сложно интерпретировать

Пример 19: Влияние замораживания/оттаивания на стабильность

10 неактивирующих вариантов антител IgG1-изотипа

Изучали влияние циклов замораживания/оттаивания на стабильность вариантов антител IgG1-изотипа, несущих неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, с помощью анализов, описанных в примере 18.

15 Образцы вариантов антител к человеческому CD20 и к человеческому CD3 (huCLB-T3/4) IgG1-изотипа приготавливали в ЗФР с pH 7,4 в концентрации приблизительно 20 мг/мл (диапазон концентраций 18,7 - 21,6 мг/мл; для вариантов антител к человеческому CD3 IgG1-изотипа применяли фильтрацию). ЗФР применяли в качестве не являющегося оптимальным

наполнителя, позволяющего более надежно осуществлять сравнение стабильности белков. Варианты IgG1 к человеческому CD20 IgG1 несли либо мутацию K409R, либо мутации L234F-L235E-D265A-K409R, либо мутации L234F-L235E-G236R-K409R, в то время как варианты антител к человеческому CD3 IgG1-изотипа несли либо мутацию F405L, либо мутации L234F-L235E-D265A-F405L, либо мутации L234F-L235E-G236R-F405L. Два независимых идентичных образца замораживали при  $<-65^{\circ}\text{C}$  и подвергали оттаиванию при комнатной температуре (КТ) в течение трех циклов. Затем стабильность белка изучали с использованием HP-SEC, cIEF, КЭ-ДСН и DLS, которые описаны в примере 18.

С помощью HP-SEC установлено, что после трех циклов замораживания и оттаивания обнаружено увеличение процента мультимеров в образцах, содержащих варианты IgG1 к человеческому CD20, хотя проценты мультимеров, присутствующих в образцах, оказались низкими (от 0,7% до 1,2% в референс-образцах и от 1,8% до 2,8% в подвергнутых замораживанию-оттаиванию образцах). В вариантах антител к человеческому CD3 IgG1-изотипа обнаруженные проценты мультимеров находились в диапазоне от 0,2% до 0,7%, и они рассматривались как слишком низкие для того, чтобы делать надежные заключения.

С помощью cIEF-анализа не выявлено существенных различий в процентах кислого белка после замораживания и оттаивания вариантов антител к человеческим CD20 и CD3 IgG1-изотипа. В целом, в вариантах, несущих мутации L234F-L235E-D265A в комбинации либо с K409R, либо F405L, обнаружены самые высокие проценты кислых белков, также как и в референс-образцах, вероятно из-за сиаилирования D265A.

Замораживание и оттаивание образцов вариантов антител не влияло также на проценты интактных белков в любых вариантах IgG1, при этом проценты интактных белков находились в диапазоне от 99% до 100%. Аналогично этому замораживание и оттаивание образцов не влияло также на проценты HC и LC.

По данным, полученным с помощью DLS-анализа, замораживание и оттаивание образцов не влияло на средний размер (радиус) частиц. Среди вариантов IgG1 к человеческому CD20 несколько большее количество агрегатов обнаружено в вариантах, несущих мутации L234F-L235E-G236R-K409R, в то

время как среди вариантов IgG1 к человеческому CD3 наибольшее количество агрегатов обнаружено в содержащем F405L варианте.

В целом, замораживание и оттаивание образцов, содержащих варианты антител к человеческим CD20 и CD3 IgG1-изотипа, несущих неактивирующие мутации L234F-L235E-D265A или L234F-L235E-G236R в комбинации либо с K409R, либо с F405L, не приводило к релевантному повышению мультимеризации, дезамидирования или расщепления белков по сравнению с референс-образцами. Таким образом, можно сделать заключение о том, что варианты антител, несущие либо мутации L234F-L235E-G236R, либо мутации L234F-L235E-D265A, обладали сходной способностью сохранять стабильность белка после повторяющихся циклов замораживания/оттаивания.

В таблице 8 представлены проценты мультимеров и мономеров, обнаруженные с помощью HP-SEC-анализа, в образцах, содержащих варианты антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа и варианты антител к человеческому CD3 IgG1-изотипа, несущие неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, которые подвергали трем циклам замораживания/оттаивания. Указанные величины являются средними для 2 отдельных образцов, которые подвергали 3 циклам замораживания/оттаивания. HP-SEC: высокоэффективная гель-фильтрация.

В таблице 9 представлены проценты кислых, нейтральных и основных изоформ, присутствующих в образцах, содержащих варианты антител к человеческим CD20 и CD3 IgG1-изотипа, несущие неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, которые подвергали одному или двум циклам замораживания/оттаивания, полученные с помощью cIEF-анализа. Изменение процента кислого белка, присутствующего в образце, использовали в качестве суррогатного показателя дезамидирования. Указанные величины являются средними для 2 отдельных образцов, которые подвергали 3 циклам замораживания/оттаивания. cIEF: капиллярное изоэлектрическое фокусирование.

В таблице 10 представлены проценты интактного белка и сумма HC + LC, полученные с помощью КЭ-ДСН-анализа, и средний радиус (в нм), установленный с помощью DLS-анализа, обнаруженные в образцах, которые содержали варианты антител к человеческим CD20 и CD3 IgG1-изотипа,

несущие неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, которые подвергали трем циклам замораживания/оттаивания. Указанные величины являются средними для 2 отдельных образцов, которые подвергали 3 циклам замораживания/оттаивания. КЭ-ДСН: капиллярный электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия; DLS: динамическое рассеяние света.

Таблица 8

Вариант антитела	Режим	HP-SEC			
		Мультимеры (%)	Мономеры (%)	Расщепление (%)	
IgG1-CD20 <sup>1</sup>	L234F-L235E-D265A-K409R	Референс-образцы	1,1	98,6	0,3
		Замораживание/оттаивание	1,8	98,0	0,4
	K409R	Референс-образцы	1,2	98,4	0,4
		Замораживание/оттаивание	2,8	96,8	0,4
	L234F-L235E-G236R-K409R	Референс-образцы	0,7	99,3	0,0
		Замораживание/оттаивание	2,0	98,0	0,0
IgG1-CD3 <sup>1</sup>	L234F-L235E-D265A-F405L	Референс-образцы	0,2	99,6	0,2
		Замораживание/оттаивание	0,3	99,5	0,2
	F405L	Референс-образцы	0,2	99,6	0,2
		Замораживание/оттаивание	0,7	99,2	0,2
	L234F-L235E-G236R-F405L	Референс-образцы	0,4	99,6	0,0
		Замораживание/оттаивание	0,6	99,4	0,0

<sup>1</sup> Тестирование в стрессовых условиях осуществляли при концентрации IgG ~ 20 мг/мл

10

Таблица 9

Вариант антитела	Режим	cIEF			
		Кислые изоформы (%)	Нейтральные изоформы (%)	Основные изоформы (%)	
IgG1-CD20 <sup>1</sup>	L234F-L235E-D265A-K409R	Референс-образцы	45	51	4
		Замораживание/оттаивание	45	53	2
	K409R	Референс-образцы	39	54	7
		Замораживание/оттаивание	39	54	8
	L234F-L235E-G236R-K409R	Референс-образцы	20	76	4

Вариант антитела		Режим	сIEF		
			Кислые изоформы (%)	Нейтральные изоформы (%)	Оснóвные изоформы (%)
		Замораживание/ оттаивание	20	75	5
IgG1-CD3 <sup>1</sup>	L234F-L235E- D265A-F405L	Референс- образцы	48	52	0
		Замораживание/ оттаивание	46	54	0
	F405L	Референс- образцы	20	77	3
		Замораживание/ оттаивание	19	79	2
	L234F-L235E- G236R-F405L	Референс- образцы	16	82	2
		Замораживание/ оттаивание	17	82	1

<sup>1</sup> Тестирование в стрессовых условиях осуществляли при концентрации IgG ~ 20 мг/мл

**Таблица 10**

Вариант антитела		Режим	CE-SDS		DLS
			Интактный IgG1 (%)	HC+LC (%)	Радиус (нм)
IgG1-CD20 <sup>1</sup>	L234F-L235E- D265A-K409R	Референс- образцы	99	100	6,4
		Замораживание/ оттаивание	99	99,5	6,7
	K409R	Референс- образцы	100	99	6,1
		Замораживание/ оттаивание	100	98	6,2
	L234F-L235E- G236R-K409R	Референс- образцы	100	100	11,7
		Замораживание/ оттаивание	100	100	12,1
IgG1-CD3 <sup>1</sup>	L234F-L235E- D265A-F405L	Референс- образцы	99	100	8,8
		Замораживание/ оттаивание	99	99	8,9
	F405L	Референс- образцы	99	100	21,0
		Замораживание/ оттаивание	99	99,5	7,5
	L234F-L235E- G236R-F405L	Референс- образцы	99	100	7,5
		Замораживание/ оттаивание	99	100	7,5

5

<sup>1</sup> Тестирование в стрессовых условиях осуществляли при концентрации IgG ~ 20 мг/мл

Пример 20: Влияние стресса, индуцированного низким значением pH, на стабильность неактивирующих вариантов антител IgG1-изотипа

В примере 18 описано исследование влияния низких или высоких температур хранения вариантов антител IgG1-изотипа, несущих неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, с использованием нескольких анализов стабильности белка. Такие же анализы применяли в примере 19 для оценки влияния циклов замораживания/оттаивания на стабильность указанных вариантов антител IgG1-изотипа. В настоящем исследовании изучали влияние стресса, индуцированного низкими значениями pH, с использованием анализов, описанных в примере 18, поскольку инактивацию вирусов при разработке терапевтического применения антител часто осуществляют в условиях низкого pH.

Образцы вариантов антител к человеческому CD20 и к человеческому CD3 (huCLB-T3/4) IgG1-изотипа приготавливали в ЗФР с pH 7,4 в концентрации приблизительно 20 мг/мл (диапазон концентраций 18,7 - 21,6 мг/мл; для вариантов антител к человеческому CD3 применяли фильтрацию). Варианты IgG1 к человеческому CD20 IgG1 несли либо мутацию K409R, либо мутации L234F-L235E-D265A-K409R, либо мутации L234F-L235E-G236R-K409R, в то время как варианты антител к человеческому CD3 IgG1-изотипа несли либо мутацию F405L, либо мутации L234F-L235E-D265A-F405L, либо мутации L234F-L235E-G236R-F405L. Указанные варианты антител приготавливали в ЗФР (стандарт) и осуществляли замену буфера на содержащий 0,02М цитрат натрия буфер (pH 3,0; фирма Sigma-Aldrich, каталожный № C1909-500G) в течение 1 ч (при комнатной температуре) или 24 ч (при 2-8°C), после чего осуществляли следующую замену буфера вновь на ЗФР. Затем изучали стабильность белков с использованием HP-SEC, cIEF, КЭ-ДСН и DLS, которые описаны в примере 18.

В то время как определенный с помощью HP-SEC-анализа процент мультимеров, присутствующих в образцах IgG1 к человеческому CD20, существенно увеличивался при pH 3,0 в случае вариантов, несущих мутации L234F-L235E-D265A-K409R, для обоих вариантов, содержащих K409R- и L234F-L235E-G236R-K409R, обнаружено меньшее увеличение процента мультимеров. Проценты мультимеров, обнаруженных в образцах, которые выдерживали в условиях с pH 3,0 в течение 1 ч или 24 ч, оказались сходными. Среди вариантов

IgG1 к человеческому CD3 в образцах, которые содержали варианты, несущие мутации L234F-L235E-D265A-F405L или L234F-L235E-G236R-F405L, в обоих обнаружено увеличение присутствия мультимеров при pH 3,0 (1 ч и 24 ч).

5 Указанные проценты оказались более высокими по сравнению с обнаруженными в образце, включающем содержащий F405L вариант.

Данные, полученные с помощью cIEF-анализа, продемонстрировали наличие хвоста на основной стороне нейтрального пика для всех вариантов IgG1 к человеческому CD20, которые инкубировали при pH 3,0 в течение либо 1, либо 24 ч. Для вариантов IgG1 к человеческому CD3, несущих неактивирующие мутации L234F-L235E-D265A-F405L или L234F-L235E-G236R-F405L, обнаружено увеличение процента кислого белка при pH 3,0, но это не обнаружено для содержащего F405L варианта. Хотя увеличение содержания кислого белка обнаружено при pH 3,0 для обоих содержащих L234F-L235E-D265A-F405L и L234F-L235E-G236R-F405L вариантов по сравнению с референс-образцом (pH 7,4), содержащий L234F-L235E-D265A-F405L вариант уже имел более высокой процент кислого белка при pH 7,4, чем содержащий L234F-L235E-G236R-F405L вариант, вероятно из-за сиаилирования D265A. Следует отметить, что увеличенные проценты кислых белков в образцах, которые содержали варианты IgG1 к человеческому CD3, несущие неактивирующие мутации, может отражать увеличение пиков, обнаруженных в этих образцах при pH 3,0, что может быть связано с увеличением количества агрегатов, образовавшихся в образце.

КЭ-ДСН-анализ не выявил каких-либо различий в процентах интактных IgG1 или суммы HC + LC между образцами, приготовленными либо в ЗФР, либо в буфере с pH 3,0. Кроме того, при использовании DLS обнаружено увеличение среднего размера частиц при выдерживании антител к человеческому CD20 IgG1-L234F-L235E-D265A-K409R при pH 3,0 в течение 1 ч или 24 ч. Более крупный размер частиц в референс-образце на основе ЗФР, содержащем вариант антитела к человеческому CD20 IgG1-L234F-L235E-G236R-K409R, и образце, содержащем вариант антитела к CD3 IgG1-F405L, можно объяснить удалением агрегатов в процессе замены буфера. Помимо этих данных, никаких существенных различий в размере частиц не выявлено между образцами, приготовленными только в ЗФР, или в ЗФР после инкубации при pH 3,0.

В целом, увеличение присутствия мультимеров выявлено в образцах, содержащих варианты антител к человеческому CD20 или CD3 IgG1-изотипа, несущих мутацию либо F405L, либо K409R и/или неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, когда образцы инкубировали при pH 3,0, по сравнению с образцами, приготовленными в ЗФР при физиологическом значении pH. У варианта IgG1 к человеческому CD20, несущего мутации L234F-L235E-D265A-K409R, обнаружено более значительное увеличение уровня мультимеризации, чем у варианта, несущего мутации L234F-L235E-G236R-K409R. Образование хвоста нейтрального пика на основной стороне обнаружено для всех протестированных вариантов IgG1 к человеческому CD20 при pH 3,0, однако результаты для вариантов антител к человеческому CD3 IgG1-изотипа, несущих неактивирующие мутации, были неубедительными из-за наличия пиков, обнаруженных в образцах, которые выдерживали при pH 3,0. Хотя кислые условия (pH 3,0) не влияли на целостность белка, относительное увеличение среднего размера частиц обнаружено для антитела к человеческому CD20 IgG1-L234F-L235E-D265A-K409R после инкубации при pH 3,0.

Таким образом, при инкубации при низком значении pH у вариантов антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа, несущих мутации L234F-L235E-G236R, обнаружен меньший уровень агрегации по сравнению с вариантами, несущими мутации L234F-L235E-D265A. Это свидетельствует о том, что варианты антител, содержащие L234F-L235E-G236R, могут оказаться более предпочтительными по сравнению с вариантами, содержащими L234F-L235E-D265A, во время процедур инактивации вирусов при низком значении pH.

В таблице 11 представлены проценты мультимеров и мономеров, которые обнаружены с помощью HP-SEC-анализа, в образцах, содержащих варианты антител к человеческим CD20 и CD3 (huCLB-T3/4) IgG1-изотипа, несущих неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, которые приготавливали в ЗФР, или после инкубации в содержащем 0,02М цитрат натрия буфере (pH 3,0) в течение 1 или 24 ч.

В таблице 12 представлены проценты кислых, нейтральных и основных изоформ, присутствующих в образцах, которые содержали варианты антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа и к CD3 (-huCLB-T3/4) IgG1-изотипа, несущих неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи,

которые приготавливали в ЗФР или в содержащем 0,02М цитрат натрия буфере (рН 3,0) и выдерживали в течение 1 или 24 ч, по данным, полученным с помощью сIEF-анализа.

В таблице 13 представлены проценты интактного IgG и суммы HC + LC, по данным, полученным с помощью КЭ-ДСН, и данные о среднем радиусе частиц (в нм), полученные с помощью DLS-анализа, обнаруженные в образцах, которые содержали варианты антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа и к CD3 (-huCLB-T3/4) IgG1-изотипа, несущих неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, которые приготавливали в ЗФР или в содержащем 0,02М цитрат натрия буфере (рН 3,0), и выдерживали в течение 1 или 24 ч.

Таблица 11

Вариант антитела	Режим	HP-SEC			
		Мультимеры (%)	Мономеры (%)	Расщепление (%)	
IgG1-CD20 <sup>1</sup>	L234F-L235E-D265A-K409R	Референс-образцы	1,1	98,6	0,3
		рН 3.0 1ч	57,9	41,7	0,3
		рН 3.0 24 ч	59,9	39,7	0,4
	K409R	Референс-образцы	1,2	98,4	0,4
		рН 3.0 1ч	16,1	83,4	0,4
		рН 3.0 24 ч	14,5	85,1	0,4
	L234F-L235E-G236R-K409R	Референс-образцы	0,7	99,3	0
		рН 3.0 1ч	14,3	85,7	0
		рН 3.0 24 ч	17,1	82,9	0
IgG1-CD3 <sup>1</sup>	L234F-L235E-D265A-F405L	Референс-образцы	0,2	99,6	0,2
		рН 3.0 1ч	26,2	73,6	0,3
		рН 3.0 24 ч	19	80,2	0,9
	F405L	Референс-образцы	0,2	99,6	0,2
		рН 3.0 1ч	17,2	82,5	0,2
		рН 3.0 24 ч	16,2	83,6	0,2
	L234F-L235E-G236R-F405L	Референс-образцы	0,4	99,6	0
		рН 3.0 1ч	22,4	77,6	0
		рН 3.0 24 ч	20,3	79,7	0

<sup>1</sup> Тестирование в стрессовых условиях осуществляли при концентрации IgG ~ 20 мг/мл

Таблица 12

Вариант антитела		Режим	сIEF		
			Кислые изоформы (%)	Нейтральные изоформы (%)	Основные изоформы (%)
IgG1-CD20 <sup>1</sup>	L234F-L235E- D265A-K409R	Референс- образцы	45	51	4
		pH 3,0 1ч	36	48	16
		pH 3,0 24ч	33	50	17
	K409R	Референс- образцы	39	54	7
		pH 3,0 1ч	34	53	12
		pH 3,0 24ч	35	54	11
	L234F-L235E- G236R-K409R	Референс- образцы	20	76	4
		pH 3,0 1ч	18	69	13
		pH 3,0 24ч	18	69	13
IgG1-CD3 <sup>1</sup>	L234F-L235E- D265A-F405L	Референс- образцы	48	52	0
		pH 3,0 1ч	65 <sup>2</sup>	35	0
		pH 3,0 24ч	61 <sup>2</sup>	39	0
	F405L	Референс- образцы	20	77	3
		pH 3,0 1ч	19	81	0
		pH 3,0 24ч	18	81	1
	L234F-L235E- G236R-F405L	Референс- образцы	16	82	2
		pH 3,0 1ч	28 <sup>3</sup>	71	1
		pH 3,0 24ч	29 <sup>3</sup>	69	2

<sup>1</sup> Тестирование в стрессовых условиях осуществляли при концентрации IgG ~ 20 мг/мл

<sup>2</sup> Присутствие пиков

5 <sup>3</sup> Присутствие дополнительных видов на кислой стороне

Таблица 13

Вариант антитела		Режим	CE-SDS		DLS
			Интактный IgG1 (%)	HC+LC (%)	Радиус (нм)
IgG1-CD20 <sup>1</sup>	L234F-L235E- D265A-K409R	Референс- образцы	99	100	6,4
		pH 3,0 1ч	100	99	10,2
		pH 3,0 24ч	99	100	12,3
	K409R	Референс- образцы	100	99	6,1
		pH 3,0 1ч	100	99	7,1
		pH 3,0 24ч	100	100	8,1
	L234F-L235E- G236R-K409R	Референс- образцы	100	100	11,7 <sup>2</sup>
		pH 3,0 1ч	100	100	7
		pH 3,0 24ч	100	100	8,1
IgG1-CD3 <sup>1</sup>	L234F-L235E- D265A-F405L	Референс- образцы	99	100	8,8

Вариант антитела		Режим	CE-SDS		DLS
			Интактный IgG1 (%)	НС+LC (%)	Радиус (нм)
F405L	pH 3,0	1ч	100	99	9,4
		24ч	100	99	9,8
	Референс-образцы		99	100	21,0 <sup>2</sup>
		pH 3,0 1ч	100	99	8
		pH 3,0 24ч	99	100	8,5
L234F-L235E-G236R-F405L	Референс-образцы		99	100	7,5
		pH 3,0 1ч	99	100	9,1
		pH 3,0 24ч	99	99	9,4

<sup>1</sup> Тестирование в стрессовых условиях осуществляли при концентрации IgG ~ 20 мг/мл

<sup>2</sup> Мульти-modalность

#### 5 Пример 21: Оценка стабильности неактивирующих вариантов антител IgG1-изотипа при низком значении pH

В примере 20 описано изучение влияния низкого значения pH на стабильность вариантов антител IgG1-изотипа, несущих неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, с использованием нескольких анализов стабильности белка. В настоящем исследовании изучали влияние стресса, индуцированного низкими значениями pH (pH 3,5), через 0,5, 1 и 4 ч при КТ с использованием анализов, описанных в примере 18.

Образцы вариантов антител к человеческому CD20 и человеческому CD3 (huCLB-T3/4) приготавливали в ЗФР с pH 7,4 в концентрации приблизительно 5 мг/мл (диапазон концентраций 4,98 - 5,3 мг/мл). Варианты IgG1-CD20 несли мутации либо L234F-L235E-D265A-K409R, либо L234F-L235E-G236R-K409R, а варианты антител IgG1-CD3 несли мутации либо L234F-L235E-D265A-F405L, либо L234F-L235E-G236R-F405L. Для оценки воздействия экспозиции в условиях низкого pH (3,5), в образцах, содержащих варианты антител, осуществляли замену буфера на содержащий 0,02М цитрат натрия буфер (pH 3,5) и выдерживали в течение 0,5 ч, 1 ч и 4 ч при комнатной температуре, после чего осуществляли следующую замену буфера вновь на ЗФР. Стабильность белков оценивали с использованием HP-SEC, КЭ-ДСН и DLS согласно описанному в примере 19 методу.

По данным HP-SEC-анализа никакого увеличения процента мультимеров в образцах, которые содержали варианты антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа, несущих неактивирующие мутации, не выявлено в моменты времени, составляющие 0,5 ч, 1 ч и 4 ч, когда образцы инкубировали при pH 3,5. Процент мультимеров в вариантах IgG1 к человеческому CD3, несущих мутации L234F-L235E-G236R-F405L, со временем несколько увеличивался. Процент обнаруженных мультимеров значительно увеличивался со временем при pH 3,5 в образцах, содержащих вариант IgG1-huCLB-T3/4-L234F-L235E-D265A-F405L.

С помощью КЭ-ДСН-анализа не выявлено никаких изменений в процентах интактного IgG или суммы HC + LC во всех протестированных образцах, когда образцы инкубировали либо при pH 7,4 (ЗФР), либо при pH 3,5. Кроме того, не обнаружено существенных различий в среднем размере частиц между всеми образцами, которые выдерживали либо при pH 7,4, либо при pH 3,5, по данным DLS-анализа. Увеличение размера частица в референс-образце IgG1-CD20-L234F-L235E-G236R-K409R можно объяснить присутствием агрегированных частиц в применяемой контрольной партии, которые были удалены в процессе замены буфера и которые, следовательно, не были обнаружены в подвергаемых связанному с pH стрессу образцах.

В целом, не обнаружено повышения уровня мультимеризации в вариантах антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа, несущих неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, после экспозиции при pH 3,5 в течение 0,5 ч, 1 ч или 4 ч. Хотя для вариантов IgG1 к человеческому CD3, несущих мутации L234F-L235E-G236R-F405L, продемонстрировано небольшое повышение уровня мультимеризации при pH 3,5, указанное повышение оказалось более выраженным для варианта, несущего мутации L234F-L235E-D265A-F405L. Таким образом, подтверждено, что в соответствии с данными, представленными в примере 20, и, несмотря на зависящие от клона различия в результатах анализа, содержащие L234F-L235E-G236R варианты антител могут иметь преимущество по сравнению с содержащими L234F-L235E-D265A вариантами в отношении процедур вирусной инактивации при низких значениях pH.

В таблице 14 представлены проценты мультимеров и мономеров (расщепление во всех образцах < 0,2%) по данным HP-SEC-анализа, и проценты

интактных IgG и суммы HC + LC по данным КЭ-ДСН-анализа, в образцах, содержащих варианты антител к человеческому CD20 и человеческому CD3, которые несли неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, растворенных в ЗФР или содержащем 0,02М цитрат натрия буфере (pH 3,5), при оценке в течение 0,5 ч, 1 ч или 4 ч.

В таблице 14 представлены также средние радиусы частиц (в нм) по данным, полученным с помощью DLS-анализа, обнаруженные в образцах, содержащих варианты антител IgG1-CD20 и IgG1-CD3, которые несли неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, растворенных в ЗФР или содержащем 0,02М цитрат натрия буфере (pH 3,5), при оценке в течение 0,5 ч, 1 ч или 4 ч.

Таблица 14

Вариант антитела	Режим	HP-SEC		CE-SDS		DLS
		Мультимеры(%)	Мономеры(%)	Интактный IgG1(%)	HC + LC(%)	Радиус (нм)
L234F- L235E- D265A- K409R	референс-образцы	1,1	98,9	99	99	4,8
	0,5 ч pH 3.5	1,1	98,8	99	100	4,7
	1 ч pH 3.5	1,1	98,8	99	100	4,7
	4 ч pH 3.5	1,1	98,8	99	100	4,8
L234F- L235E- G236R- K409R	Референс-образцы	0,8	99,1	99	99	10,8 <sup>2</sup>
	0,5 ч pH 3.5	0,8	99,1	99	100	5,4
	1 ч pH 3.5	0,8	99,1	99	100	5,1
	4 ч pH 3.5	0,8	99,1	99	100	5
L234F- L235E- D265A- F405L	Референс-образцы	1,3	98,6	97	98	5
	0,5 ч pH 3.5	4,8	95,1	97	99	5
	1 ч pH 3.5	6,6	93,3	97	99	5
	4 ч pH 3.5	11,0	89,0	97	99	5,4
L234F- L235E- G236R- F405L	Референс-образцы	1,5	98,4	97	100	5
	0,5 ч pH 3.5	1,6	98,4	97	100	4,9
	1 ч pH 3.5	1,7	98,3	97	100	4,8
	4 ч pH 3,5	2,2	97,8	97	99	4,9

15 Тестирование в стрессовых условиях осуществляли при концентрации IgG ~ 5 мг/мл  
<sup>2</sup> Различия в радиусе и мас.% мономеров для контрольного образца IgG1-CD20-FERR являются следствием того, что частицы, присутствующие в партии, были удалены во время процедуры замены буфера и, следовательно, не обнаружены в подвергнутых pH-стрессу образцах

Пример 22: Оценка стабильности при низком значении pH

биспецифических вариантов антител IgG1-изотипа, несущих неактивирующие мутации

В примере 21 описано изучение влияния индуцированного низким значением pH стресса на стабильность вариантов антител IgG1-изотипа, несущих неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, через 0,5, 1 и 4 ч. В настоящем исследовании изучали влияние стресса, индуцированного низким значением pH (pH 3,5) на стабильность анти-CD3/CD20 биспецифических антител, несущих неактивирующие мутации, через 0,5, 1 и 4 ч с использованием анализов, описанных в примере 18.

Биспецифические антитела (bsAb) создавали из антител к человеческому CD3 и человеческому CD20 IgG1-изотипа, несущих неактивирующие мутации L234F-L235E-D265A или L234F-L235E-G236R в дополнение к мутации либо K409R, либо F405L, которая усиливает гетеродимеризацию полумолекулы с комплементарной полумолекулой только в контролируемых восстанавливающих условиях, с использованием процедуры контролируемого обмена Fab-плечей, которая описана в примере 1. Это позволяло создавать антитела bsIgG1-CD3xCD20, несущие либо L234F-L235E-D265A в обоих плечах, либо L234F-L235E-G236R в обоих плечах (обозначены в настоящем описании как конструкции с симметричным каркасом), или биспецифические антитела, несущие комбинацию мутаций L234F-L235E-D265A в одном плече и мутаций L234F-L235E-G236R в другом плече (обозначены в настоящем описании как конструкции с асимметричным каркасом). Образцы вариантов антител bsIgG1-CD3xCD20 приготавливали в ЗФР (pH 7,4) в концентрации приблизительно 5 мг/мл (диапазон концентраций 3,209 – 5,304 мг/мл). Для оценки влияния экспозиции в условиях низкого pH (3,5) в образцах, содержащих антитела bsIgG1-CD3xCD20, осуществляли замену буфера на содержащий 0,02М цитрат натрия буфер (pH 3,5) и выдерживали в течение 0,5 ч, 1 ч и 4 ч при комнатной температуре, после чего осуществляли следующую замену буфера вновь на ЗФР. Затем стабильность белков изучали с использованием HP-SEC, КЭ-ДСН и DLS, согласно методу, описанному в примере 18.

По данным HP-SEC-анализа не выявлено заметного влияния на мультимеризацию любых вариантов антител bsIgG1-CD3xCD20, несущих

неактивирующие мутации, при экспозиции рН 3,5 во всех протестированных моментах времени по сравнению с соответствующими им референс-образцами. По данным, полученным с использованием КЭ-ДСН, не обнаружено воздействие экспозиции при рН 3,5 на любой из протестированных вариантов bsAt, что свидетельствует о том, что все bsAt оставались интактными при экспозиции рН 3,5. Анализ среднего размера частиц с помощью DLS продемонстрировал, что выдерживание при рН 3,5 симметричных bsAt, несущих мутации L234F-L235E-D265A, а также асимметричных bsAt, несущих L234F-L235E-G236R в содержащем F405L плече, не индуцировало изменение уровней агрегации.

Небольшое снижение среднего размера, обнаруженное при рН 3,5, в любой из анализируемых моментов времени для симметричных bsAt, несущих мутации L234F-L235E-G236R, и асимметричных bsAt, несущих мутации L234F-L235E-G236R в содержащем K409R плече, могло быть следствием удаления агрегатов в процессе замены буфера.

В целом, варианты IgG1-bsAt, несущие неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, сохраняли их интактную структуру, и у них не повышалась чувствительность к мультимеризации после выдерживания в условиях низкого рН вплоть до 4 ч в концентрации приблизительно 5 мг/мл. Эти результаты свидетельствуют о том, что варианты биспецифических антител, несущие неактивирующие мутации либо L234F-L235E-G236R, либо L234F-L235E-D265A, обладали одинаковой способностью сохранять мономерность после выдерживания в условиях низкого рН, что является благоприятным свойством для терапевтической разработки процедур вирусной инактивации, применяемых при низком рН.

В таблице 15 представлены проценты мультимеров и мономеров по данным HP-SEC-анализа и проценты интактного IgG и суммы HC + LC по данным КЭ-ДСН-анализа, обнаруженные в образцах, содержащих биспецифические антитела (bsAt), которые создавали из антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа и к человеческому CD3, несущих неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи. BsAt создавали так, что они несли либо неактивирующие мутации L234F-L235E-D265A в обоих плечах, либо неактивирующие мутации L234F-L235E-G236R в обоих плечах, либо комбинацию мутаций L234F-L235E-D265A в одном плече и мутаций L234F-L235E-G236R в другом плече. Варианты антител

растворяли в ЗФР или содержащем 0,02М цитрат натрия буфере (рН 3,5) и выдерживали в течение 0,5 ч, 1 ч или 4 ч до анализа.

В таблице 16 представлены средние радиусы (в нм) и процент массы мономеров по данным, полученным с помощью DLS-анализа, обнаруженные в образцах, которые содержали варианты антител bsIgG1-CD3xCD20, несущие неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи. BsAt создавали так, чтобы они несли либо неактивирующие мутации L234F-L235E-D265A в обоих плечах, либо неактивирующие мутации L234F-L235E-G236R в обоих плечах, либо комбинацию мутаций L234F-L235E-D265A в одном плече и мутаций L234F-L235E-G236R в другом плече. Варианты антител растворяли в ЗФР или содержащем 0,02М цитрат натрия буфере (рН 3,5) и выдерживали в течение 0,5 ч, 1 ч или 4 ч до анализа.

Таблица 15

Вариант антитела bsIgG1-CD3xCD20 <sup>1</sup>	Режим	HP-SEC		CE-SDS	
		Мультимеры(%)	Мономеры(%)	Интактный IgG1(%)	HC + LC(%)
L234F-L235E-G236R-F405L X	Референс-образцы	0,9	99	98	100
	0,5 ч рН 3,5	1	99	99	100
	1 ч рН 3,5	1	99	100	100
	4 ч рН 3,5	1	99	99	100
L234F-L235E-D265A-F405L X	Референс-образцы	1,4	98,5	98	100
	0,5 ч рН 3,5	1,4	98,6	99	99
	1 ч рН 3,5	1,4	98,5	100	99
	4 ч рН 3,5	1,4	98,6	99	100
L234F-L235E-G236R-F405L X	Референс-образцы	1,2	98,7	98	100
	0,5 ч рН 3,5	1,1	98,8	98	100
	1 ч рН 3,5	1,1	98,8	99	100
	4 ч рН 3,5	1,1	98,8	99	100
L234F-L235E-D265A-F405L X	Референс-образцы	1,3	98,7	98	99
	0,5 ч рН 3,5	1,2	98,8	98	98
	1 ч рН 3,5	1,2	98,8	99	100
	4 ч рН 3,5	1,1	98,9	99	99

15 <sup>1</sup> Тестирование в стрессовых условиях осуществляли при концентрации IgG ~ 5 мг/мл

Таблица 16

Вариант антитела bsIgG1-CD3xCD20 <sup>1</sup>	Режим	DLS
		Радиус (нм)
L234F-L235E-G236R-F405L X L234F-L235E-G236R-K409R	Референс-образцы	5,9
	0,5 ч рН 3,5	5,1
	1 ч рН 3,5	4,9
	4 ч рН 3,5	4,9
L234F-L235E-D265A-F405L X L234F-L235E-D265A-K409R	Референс-образцы	4,9
	0,5 ч рН 3,5	4,8
	1 ч рН 3,5	4,8
	4 ч рН 3,5	4,9
L234F-L235E-G236R-F405L X L234F-L235E-D265A-K409R	Референс-образцы	4,9
	0,5 ч рН 3,5	4,8
	1 ч рН 3,5	4,8
	4 ч рН 3,5	5,1
L234F-L235E-D265A-F405L X L234F-L235E-G236R-K409R	Референс-образцы	6,7
	0,5 ч рН 3,5	5,3
	1 ч рН 3,5	5
	4 ч рН 3,5	4,9

<sup>1</sup> Тестирование в стрессовых условиях осуществляли при концентрации IgG ~ 5 мг/мл

5 Пример 23: Оценка стабильности при низком значении рН вариантов антител к CD20 и к gp120 IgG1-изотипа, несущих неактивирующие мутации

В примере 21 описано изучение влияния индуцированного низким рН (3,5) стресса на стабильность вариантов антител IgG1-изотипа, несущих неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, после выдерживания в течение через 0,5, 1 и 4 ч. В настоящем исследовании изучали влияние стресса, индуцированного низким значением рН (рН 3,5) на стабильность антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа и к gp120 (HIV1) IgG1-b12, несущих неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, в комбинации с мутацией K409R, после выдерживания в течение 0,5 ч, 1 ч, 2 ч, 4 ч и 24 ч с использованием HP-SEC-анализа, описанного в примере 18. Уровень мультимеризации в условиях низкого рН анализировали для указанных вариантов антител в качестве показателя нестабильности белка, что является важным в контексте процедур вирусной инактивации при терапевтической разработке антител.

Образцы вариантов антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа и IgG1-b12 приготавливали с ЗФР в концентрации приблизительно 0,5 мг/мл (диапазон концентраций 0,435 – 0,5 мг/мл). Варианты IgG1 к человеческому CD20 и IgG1-b12 несли мутации либо L234F-L235E-D265A-K409R, либо L234F-L235E-G236R-K409R. Для оценки влияния выдерживания в условиях низкого pH (3,5) образцы, содержащие варианты антител в ЗФР, подкисляли, добавляя по каплям 2М уксусную кислоту (фирма Fluka, каталожный № 33209) до pH 3,5, затем инкубировали при КТ в течение 0,5 ч, 1 ч, 2 ч, 4 ч или 24 ч с использованием шейкера для планшетов. После инкубации образец из каждой пробирки для образца переносили в пробирку, содержащую 2М Трис-НСl (pH 9,0; фирма Sigma-Aldrich, каталожный № Т6066), для восстановления pH до 7,4. Затем изучали стабильность белка с использованием HP-SEC, согласно методу, описанному в примере 18.

HP-SEC-анализ выявил быстрое повышение уровня мультимеризации в образцах, которые содержали вариант IgG1 к человеческому CD20, несущий мутации L234F-L235E-D265A-K409R, в ответ на инкубацию при pH 3,5, который достигал максимума после инкубации в течение 2 ч, при этом в образце обнаружено 35,2% мультимеров. В отличие от этого, выдерживание варианта IgG1 к человеческому CD20, несущего мутации L234F-L235E-G236R-K409R, при pH 3,5 приводило к стабильному и относительно медленному повышению уровня мультимеризации в зависимости от времени, при этом максимальное содержание мультимеров в образце, проанализированном после инкубации в течение 24 ч, составляло 10,8%.

Весьма сходная картина обнаружена для вариантов IgG1-b1, несущих неактивирующие мутации. Хотя для варианта, несущего мутации L234F-L235E-D265A-K409R, обнаружено быстрое увеличение мультимеризации, при этом максимальный уровень мультимеров, составляющий 27,6%, обнаружен после инкубации в течение 2 ч при pH 3,5, для варианта, несущего мутации L234F-L235E-G236R-K409R, обнаружено более медленное и более слабое увеличение мультимеризации при pH 3,5, при этом максимальный уровень мультимеров, составляющий 18%, обнаружен после инкубации при pH 3,5 в течение 24 ч.

В целом, HP-SEC-анализ продемонстрировал, что процесс мультимеризации происходил быстрее и более интенсивно для вариантов

антител, несущих мутации L234F-L235E-D265A-K409R, по сравнению с вариантами, несущими мутации L234F-L235E-G236R-K409R. Таким образом, можно сделать заключение о том, что варианты и других клонов антител, несущих неактивирующие мутации L234F-L235E-G236R, должны обладать более высокой способностью сохранять мономерность в условиях низкого pH, чем содержащие L234F-L235E-D265A варианты. Сохранение мономерности при низких значениях pH является благоприятной характеристикой для проведения процедур вирусной инактивации, которые осуществляют при низком pH.

В таблице 17 представлены проценты мультимеров, мономеров и уровней расщепления по данным HP-SEC-анализа в образцах, содержащих варианты антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа и анти-gp120 (HIV1) IgG1-b12, несущих неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, которые растворяли в 3ФР или натрий-ацетатном буфере (pH 3,5) и выдерживали в течение 0,5 ч, 1 ч, 2 ч, 4 ч или 24 ч.

15 Таблица 17

Вариант антитела	Режим	HP-SEC				
		Мультимеры (%)	Мономеры (%)	Расщепление (%)		
IgG1-CD20 <sup>1</sup>	L234F-L235E-D265A-K409R	Референс-образцы	0,9	98,9	0,3	
		0,5 ч pH 3,5	24,8	74,9	0,3	
		1 ч pH 3,5	34,1	65,6	0,3	
		2 ч pH 3,5	35,2	64,5	0,3	
		4 ч pH 3,5	33,8	65,9	0,3	
		24 ч pH 3,5	29,6	70	0,3	
	L234F-L235E-G236R-K409R	Референс-образцы	0,5	99,5	0	
		0,5 ч pH 3,5	1,4	98,6	0	
		1 ч pH 3,5	3,6	96,4	0	
		2 ч pH 3,5	5,3	94,7	0	
		4 ч pH 3,5	6,5	93,5	0	
		24 ч pH 3,5	10,8	89,2	0	
	IgG1-gp120 <sup>1</sup>	L234F-L235E-D265A-K409R	Референс-образцы	1,8	98,2	0
			0,5 ч pH 3,5	18,2	81,8	0
1 ч pH 3,5			26,7	73,3	0	
2 ч pH 3,5			27,6	72,4	0	
4 ч pH 3,5			26,7	73,3	0	
24 ч pH 3,5			17,3	82,7	0	
L234F-L235E-G236R-K409R		Референс-образцы	1,1	98,9	0	
		0,5 ч pH 3,5	3,4	96,7	0	
		1 ч pH 3,5	5,5	94,5	0	
		2 ч pH 3,5	7,2	92,8	0	

Вариант антитела		Режим	HP-SEC		
			Мультивмеры (%)	Мономеры (%)	Расщепление (%)
		4 ч pH 3,5	8,1	91,9	0
		24 ч pH 3.5	18	81,6	0,4

<sup>1</sup> Тестирование в стрессовых условиях осуществляли при концентрации IgG ~ 0,5 мг/мл, 0,5 мг/мл для референс-образца, 0,435 мг/мл при pH 3,5)

## 5 Аспекты возможности совершенствования антител с использованием FER-формата для терапевтических целей

В примерах 15-23 оценивали различные аспекты, касающиеся возможности совершенствования антител для терапевтических целей. Прежде всего, не выявлено заметных различий в возможности формировать биспецифические антитела при использовании вариантов антител, несущих либо мутации L234F-L235E-D265A (FEA), либо мутации L234F-L235E-G236R (FER). Кроме того, уровень производства вариантов антител, несущих либо мутации FEA, либо мутации FER, оказался сходным. Для высококонцентрированных образцов вариантов антител, несущих мутации FER, продемонстрировано улучшенная стабильность белка и меньшая тенденция к агрегации по сравнению с вариантами антител, несущих мутации FEA. Выдерживание вариантов антител при 40°C в течение 4 месяцев приводило к повышению мультимеризации всех протестированных вариантов, уровень которой зависел от клона антител. Кроме того, циклы замораживания-оттаивания не влияли на стабильность белка вариантов антител, несущих либо мутации FEA, либо мутации FER. Важно отметить, что варианты антител, несущих мутации FER, обладали более высокой устойчивостью к стрессу, индуцированному условиями низкого pH, по сравнению с вариантами, несущими мутации FEA.

Интродукция мутаций FEA в Fc-область антител IgG1-изотипа приводила к получению вариантов антител, которые было легче создавать, и такие варианты антител в настоящее время широко используются при разработке клинических продуктов и для клинического применения. В свете вышеуказанного, профиль стабильности белка и возможность совершенствования вариантов антител в том случае, когда требуется инертный формат, можно было бы дополнительно улучшить путем введения мутаций FER вместо существующих мутаций. Таким

образом, содержащие FER варианты могут быть предпочтительными с точки зрения совершенствования моноспецифических или мультиспецифических антител для клинического применения. В частности, установлено, что варианты антител, несущие мутации FER, являются менее чувствительными к воздействию условий низкого pH, что является полезным свойством для процедур вирусной инактивации, которые часто применяют и которые необходимы при разработке терапевтических антител для применения на человеке.

Пример 24: C1q-связывание и комплементзависимая цитотоксичность антител к человеческому CD20 и их вариантов, содержащих различные наборы неактивирующих мутаций в каждой тяжелой цепи

В примерах 3 и 5 продемонстрировано, что интродукция мутаций L234F-L235E-G236R (FER) в константную область тяжелой цепи (HC) антител к человеческим CD20 и HLA-DR, подобных IgG1 дикого типа, приводила к практически полной элиминации способности индуцировать CDC. Это согласуется со снижением связывания C1q вариантами антител, несущих мутации FER, что описано в примере 4. В настоящем исследовании оценивали способность связываться с фактором комплемента C1q антител к человеческому CD20, содержащих две HC, которые несли либо мутации L234F-L235E-D265A (FEA), либо мутации FER в обеих HC, и вариантов, которые содержали мутации FEA в одной HC и мутации FER в другой HC. Кроме того, изучали способность вариантов антител индуцировать CDC.

Антитела к человеческому CD20 IgG1-CD20 дикого и их варианты, несущие неактивирующие мутации FEA или FER в обеих HC, или варианты, содержащие мутации FEA в одной HC и мутации FER в другой HC (обозначены далее как "асимметричные варианты"), в дополнение к мутации K409R или F405L, тестировали в отношении связывания C1q с клетками Raji с использованием 20%-ной нормальной человеческой сыворотки (NHS, M0008, фирма Sanquin) в качестве источника C1q, согласно процедуре, описанной в примере 4.

Асимметричные варианты антител к человеческому CD20 создавали посредством контролируемого обмена Fab-плечей, в целом, согласно методу, описанному в примере 1. Связывание C1q с вариантами антител оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием устройства Intellicyt iQue

5 screener (фирма Sartorius) путем измерения медианной интенсивности флуоресценции FITC. Данные анализировали с использованием нелинейной модели зависимости ответа от дозы агониста и для каждой экспериментальной повторности рассчитывали площадь под кривой (AUC), построенной с использованием преобразованных в log концентраций, с помощью GraphPad PRISM (версия 8.4.1, фирма GraphPad Software), применяя в качестве исходного уровня данные для контроля без антитела, с последующей стандартизацией для каждой экспериментальной повторности относительно значения AUC, измеренного для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%), и значения AUC, измеренного для варианта антитела дикого типа IgG1-изотипа (IgG1-CD20, 100%). Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM, полученные в 3 независимых экспериментах.

10 Те же варианты антител, связывание с C1q которых тестировали, оценивали с помощью CDC-анализа *in vitro*. Варианты антител тестировали в диапазоне концентраций (конечные концентрации 0,014-10 мкг/мл; 3-кратные разведения) с использованием  $5 \times 10^4$  клеток Raji на лунку, в целом, согласно методу, описанному также в примере 3. Количество PI-позитивных клеток, в качестве показателя лизиса клеток, определяли методом проточной цитометрии с использованием устройства Intellicyt iQue screener (фирма Sartorius). Данные анализировали с использованием нелинейной модели зависимости ответа от дозы агониста, и для каждой экспериментальной повторности рассчитывали площадь под кривой (AUC), построенной с использованием преобразованных в log концентраций, с помощью GraphPad PRISM (версия 8.4.1, фирма GraphPad Software), применяя в качестве исходного уровня данные для контроля без антитела, с последующей стандартизацией каждой экспериментальной повторности относительно значения AUC, измеренного для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%), и значения AUC, измеренного для варианта антитела дикого типа IgG1-изотипа (IgG1-CD20, 100%). Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM, полученные в 3 независимых экспериментах.

30 Оценка связывания C1q с вариантами IgG1-CD20 продемонстрировала, что антитело IgG1-CD20 дикого типа эффективно вступает в контакт с белком комплемента C1q после связывания с CD20 на клетках-мишенях Raji.

Интродукция неактивирующих мутаций либо FEA, либо FER в сочетании либо с мутацией F405L, либо с мутацией K409R резко снижала связывание с C1q (фиг. 16). Связывание C1q в более значительной степени снижалось с вариантами IgG1-CD20, несущими мутации FER, чем с вариантами IgG1-CD20, несущими мутации FEA, вне зависимости от того, содержали ли обе HC мутацию либо K409R, либо F405L, или содержала ли одна HC мутацию K409R, а другая HC содержала мутацию F405L. Полная элиминация связывания C1q обнаружена для асимметричного варианта BisG1-CD20 FEA-F405LxFER-K409R, при этом значительное снижение связывания C1q обнаружено и для другого асимметричного варианта, BisG1-CD20 FER-F405LxFEА-K409R (фиг. 16).

Оценка способности индуцировать CDC этих же вариантов IgG1-CD20 продемонстрировала, что способность элиминировать CDC наиболее сильно подавлялась при интродукции мутации FER вне зависимости от того, содержали ли обе HC либо мутацию K409R, либо мутацию F405L, или от того, содержала ли одна HC мутацию K409R, а другая HC содержала мутацию F405L (фиг. 17). Остаточная CDC обнаружено для варианта IgG1-CD20, содержащего мутации FEA-K409R, и в меньшей степени для IgG1-CD20-FEA-F405L, по сравнению с вариантом дикого типа IgG1-CD20. Незначительная остаточная CDC обнаружена для асимметричного варианта BisG1-CD20 FEA-F405LxFER-K409R. Снижение способности индуцировать CDC у BisG1-CD20 FER-F405LxFEА-K409R оказалось сопоставимой с обнаруженной для BisG1-CD20 FEA-F405LxFEА-K409R.

Таким образом, связывание антитела к человеческому CD20 IgG1-изотипа с C1q наиболее сильно подавлялось путем интродукции мутаций FER в обе HC, или интродукции указанных мутаций в одну HC, которая дополнительно содержала мутацию K409, и мутации FEA-F405L в другую HC. Способность индуцировать CDC наиболее значительно подавлялась путем интродукции мутаций FER, чем мутаций FEA. Асимметричные варианты, содержащие мутации FER в одной HC и мутации FEA в другой HC, также обладали в значительной степени пониженной способностью индуцировать CDC, которая уменьшалась до уровня, промежуточного по отношению к вариантам, несущим мутации либо FER, либо FEA в обеих HC.

Пример 25: Опосредуемая Т-клетками цитотоксичность *in vitro*, индуцируемая вариантами антител, которые содержали различные наборы неактивирующих мутаций в каждой тяжелой цепи

В примере 11 продемонстрировано, что интродукция мутаций L234F-  
5 L235E-G236R (FER) в константную область тяжелой цепи (НС) вариантов биспецифических антител, таргетирующих раковый антиген и Т-клетку, позволяла эффективно избегать неспецифической цитотоксичности, но сохраняла способность индуцировать специфическую опосредуемую Т-клетками цитотоксичность. В указанных экспериментах неактивирующие мутации были  
10 симметричными, т.е. присутствовали в обеих НС, несущих неактивирующие мутации FER в дополнение к мутации либо F405L, либо K409R. В настоящем исследовании опосредуемую Т-клетками цитотоксичность оценивали для биспецифических антител IgG1-изотипа CD3xHER2 и CD3xb12, несущих асимметричные неактивирующие мутации в Fc-области, т.е. одна НС несла  
15 мутации FER, а другая НС несла альтернативные неактивирующие мутации (например, L234F-L235E-D265A [FEA], L234A-L235A-P329G [AAG] или N297G).

Варианты биспецифических антител, включая варианты, которые несли асимметричные неактивирующие мутации, создавали с помощью  
20 контролируемого обмена Fab-плечей (сFAE) согласно методу, описанному в примере 1. Оценивали опосредуемую Т-клетками цитотоксичность, индуцируемую биспецифическими антителами дикого типа CD3xHER2 (к человеческому CD3 [huCLB-T3/4] IgG1-F405L и к человеческому HER2 IgG1-K409R) или CD3xb12 (к человеческому CD3 [huCLB-T3/4] IgG1-F405L и  
25 несвязывающееся контрольное антитело анти-HIV1 gp120 [b12] IgG1-K409R) и их вариантами, несущими асимметричные неактивирующие мутации в Fc-области. Протестированные биспецифические варианты несли неактивирующие мутации FER в дополнение к мутации F405L в одной НС в сочетании с неактивирующими мутациями либо FEA, либо AAG, либо N279G в дополнение к  
30 мутации K409R во второй НС. Кроме того, тестировали варианты биспецифических антител, которые несли неактивирующие мутации FER в дополнение к мутации F405L в одной НС, в сочетании со второй НС, которая не несла неактивирующих мутаций, а содержала только мутацию K409R

(требуемую для эффективного создания вариантов биспецифических антител). В качестве контролей тестировали варианты биспецифических антител без неактивирующих мутаций в НС, а также в качестве несвязывающегося контроля применяли антитело IgG1-b12. РВМС выделяли из лейкоцитарных пленок здоровых доноров путем разделения в градиенте плотности согласно методу, описанному в примере 9, промывали ЗФР и ресуспендировали в культуральной среде (RPMI-1640 с 2мМ L-глутамином и 25мМ Нерес; дополненной 10% донорской бычьей сыворотки с железом, (DBSI)). Затем РВМС замораживали при  $-150^{\circ}\text{C}$  в концентрации  $30-50 \times 10^6$  клеток/мл путем ресуспендирования РВМС в криозащитной среде, которая состояла из одной части культуральной среды (RPMI-1640 с 2мМ L-глутамином и 25мМ Нерес; дополненной 10% донорской бычьей сыворотки с железом, (DBSI) и одной части смеси, содержащей 80% DBSI и 20% диметилсульфоксида (ДМСО; фирма Sigma-Aldrich, каталожный № 41644); конечная концентрация ДМСО в криозащитной среде составляла 10%). Экспрессирующие HER2 клетки SK-OV-3 (АТСС, каталожный № НТВ-77,) культивировали в среде Маккоя 5А (фирма Lonza, каталожный № BE12-168F), дополненной 10 об.% инактивированной тепловой обработкой DBSI и пенициллином-стрептомицином (Pen/Strep, конечная концентрация 50 ед./мл калиевого пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина сульфата (фирма Lonza, каталожный № DE17-603E), и выдерживали при  $37^{\circ}\text{C}$  в увлажняющей камере в атмосфере с 5 об.%  $\text{CO}_2$ . Клетки SK-OV-3 культивировали практически до конfluence. Клетки обрабатывали трипсином и ресуспендировали в культуральной среде и затем пропускали через клеточное сито с получением суспензии единичной клетки. Высевали  $2,5 \times 10^4$  SK-OV-3-клеток в каждую лунку 96-луночного культурального планшета и клетки инкубировали в течение 4 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , давая им прикрепиться к планшету. РВМС, замороженные после выделения, как описано выше, подвергали оттаиванию. Затем РВМС промывали дважды ЗФР, после чего ресуспендировали в культуральной среде. Затем  $1 \times 10^5$  РВМС добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета, содержащего SK-OV-3-клетки-мишени, получая соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней (Е:Т) 4:1. Затем приготавливали предназначенные для оценки зависимости ответа от дозы серии биспецифических антител CD3xHER2 и CD3xb12 дикого типа и их

неактивирующих вариантов, указанных выше, в культуральной среде (конечные концентрации 0,001 – 1000 нг/мл, 10-кратные разведения) и добавляли в лунки 96-луночных культуральных планшетов, содержащих клетки SK-OV-3 и РВМС. Данные, полученные при инкубации SK-OV-3-клеток-мишеней с 2мкМ стауроспорином (фирма Sigma, каталожный № S6942-200,) применяли в качестве показателя 100%-ного цитолиза опухолевых клеток. Данные, полученные для представляющего только среду контроля (SK-OV-3-клетка, без антитела, без РВМС) применяли в качестве показателя 0%-ного цитолиза опухолевых клеток. Планшеты инкубировали в течение 3 дней при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Через три дня планшеты промывали дважды ЗФР, и в каждую лунку добавляли 150 мкл культуральной среды, содержащей 10% Alamar blue (фирма Invitrogen, каталожный № DAL1100). Планшеты инкубировали в течение 4 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Изменяли абсорбцию при 590 нм (устройство Envision, фирма Perkin Elmer, Уолтем, шт. Массачусетс). Данные визуализировали с помощью GraphPad PRISM (версия 8.4.1, фирма GraphPad Software) в виде зависимости от дозы ответа (т.е. в виде процента жизнеспособных клеток SK-OV-3), рассчитанной для каждого донора в каждой экспериментальной повторности. Данные представляют собой средние значения ± SEM, полученные для четырех доноров из двух независимых экспериментов.

Все варианты биспецифических антител CD3xHER2, включая варианты, несущие асимметричные неактивирующие мутации в Fc-области, индуцировали зависящую от дозы цитотоксичность в отношении SK-OV-3-клеток с эффективностью, сопоставимой с эффективностью варианта биспецифического антитела CD3xHER2, имеющего Fc-область с функцией, аналогичной функции Fc-области дикого типа, т.е. без неактивирующих мутаций (фиг. 18А). Аналогично данным, представленным в примере 11, биспецифическое антитело CD3xb12, сходное с антителом дикого типа (BisG1 F405LxK409R), индуцировало неспецифический цитолиз SK-OV-3-клеток, хотя и в меньшей степени, чем вариант сходного с диким типом биспецифического антитела CD3xHER2 (фиг. 18Б). Варианты биспецифического антитела CD3xb12, несущие неактивирующие мутации FER в одной HC, в сочетании с мутациями FEA (BisG1 FER-F405LxFEА-K409R) или AAG (BisG1 FER-F405LxAAG-K409R) в другой HC, не обладали цитотоксичностью в отношении клеток SK-OV-3 (фиг. 18Б),

аналогично биспецифическим вариантам CD3xb12, которые несли распределенные симметрично мутации FER, FEA или AAG (фиг. 10Б). В противоположность этому, варианты биспецифического антитела CD3xb12, несущие неактивирующие мутации FER в одной HC, в сочетании с другой HC, несущей неактивирующую мутацию N297G (BisG1 FER-F405LxN297G-K409R), индуцировали неспецифический цитолиз SK-OV-3-клеток, но в меньшей степени, чем подобный дикого типу вариант биспецифического антитела CD3xb12 (фиг. 18Б). Указанный результат согласуется с данными о том, что вариант биспецифического антитела CD3xb12 с симметричными неактивирующими мутациями N297G индуцировал также неспецифический цитолиз SK-OV-3-клеток (фиг. 10Б). Кроме того, вариант биспецифического антитела CD3xb12, несущий неактивирующие мутации FER в одной HC, в сочетании с другой HC-областью с функцией, подобной дикому типу (BisG1 FER-F405LxK409R), индуцировал также неспецифический цитолиз на уровне, сходном с уровнем цитолиза варианта CD3xb12 BisG1 FER-F405LxN297G-K409R (фиг. 18Б).

В целом, варианты биспецифических антител, мишенью которых являются раковый антиген и Т-клетка, с асимметричными неактивирующими мутациями в Fc-области, т.е. с неактивирующими мутациями FER в одной HC, и с другой HC, которая несет неактивирующие мутации либо FEA, либо AAG, сохраняли способность индуцировать специфическую опосредуемую Т-клетками цитотоксичность, но у них эффективно устранялась способность индуцировать неспецифическую цитотоксичность.

Пример 26: Т-клеточная активация в культуре PBMC, индуцированная вариантами антител, которые содержали различные наборы неактивирующих мутаций в каждой тяжелой цепи

В примере 10 продемонстрировано, что интродукция мутаций L234F-L235E-G236R (FER) в константную область тяжелой цепи (HC) антитела к человеческому CD3 IgG1-изотипа предупреждала активацию Т-клеток при оценке по повышающей регуляции CD69 в совместной культуре человеческих PBMC. В этих экспериментах неактивирующие мутации присутствовали в симметричной форме, т.е. обе HC несли неактивирующие мутации FER в дополнение к мутации либо F405L, либо K409R. В настоящем исследовании Т-

клеточную активацию изучали для биспецифических антител IgG1-изотипа CD3xHER2, несущих асимметричные неактивирующие мутации в Fc-области, т.е. одна HC несла мутации FER, а другая HC несла другие неактивирующие мутации.

5           Оценивали активацию Т-клеток в совместной культуре PBMC с помощью биспецифических антител дикого типа IgG1-изотипа CD3xHER2 и их вариантов, указанных в примере 25, которые несли асимметричные неактивирующие мутации в Fc-области. В качестве контролей тестировали вариант биспецифического антитела, несущий симметричные неактивирующие мутации FER в HC, вариант биспецифического антитела без неактивирующих мутаций в HC, а также несвязывающееся контрольное антитело IgG1-b12. Повышающую регуляцию CD69 на Т-клетках в качестве показателя Т-клеточной активации указанными вариантами антител оценивали практически в соответствии с процедурой, описанной в примере 10. В целом, приготавливали предназначенные для оценки зависимости ответа от дозы серии биспецифических антител CD3xHER2 и CD3xb12 дикого типа и их неактивирующих вариантов, указанных выше, в культуральной среде (конечная концентрация 0,001 – 1000 нг/мл, 10-кратные разведения) и вносили в лунки 96-луночного круглодонного планшета, содержащего PBMC ( $1,5 \times 10^5$  клеток/лунку) в культуральной среде. После инкубации в течение 16-24 ч определяли процент CD69-позитивных клеток среди CD28-позитивных клеток в смеси PBMC с помощью проточного цитометра Fortessa (фирма BD). Данные анализировали в виде зависимости от дозы ответа (т.е. процента CD69<sup>+</sup>-клеток среди CD28<sup>+</sup>-клеток), и для каждой экспериментальной повторности рассчитывали площадь под кривой (AUC), построенной с использованием преобразованных в log концентраций, с помощью GraphPad PRISM (версия 8.4.1, фирма GraphPad Software), используя в качестве исходного уровня фоновое окрашивание (контроль без антитела), с последующей стандартизацией для каждого донора для каждой экспериментальной повторности относительно значения AUC, измеренного для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%), и значения AUC, измеренного для варианта биспецифического антитела IgG1-изотипа, сходного с диким типом (BisG1 F405LxK409R, 100%). Данные

представляют собой средние значения  $\pm$  SEM, полученные для 4 донорах в двух независимых экспериментах.

Оценка повышающей регуляции CD69 на Т-клетках в качестве показателя ранней Т-клеточной активации продемонстрировала, что вариант биспецифического антитела, несущий симметричные неактивирующие мутации FER в HC, предупреждал повышающую регуляцию CD69 на Т-клетках в совместных культурах PBMC по сравнению со сходным с диким типом вариантом биспецифического антитела CD3xHER2 (BisG1 F405LxK409R) (фиг. 19). Это согласуется с данными, описанными в примере 10 для антитела к человеческому CD3 IgG1-изотипа, несущего неактивирующие мутации FER в дополнение к мутации F405L. Для вариантов биспецифических антител CD3xHER2, несущих неактивирующие мутации FER в одной HC, в сочетании с мутациями FEA (BisG1 FER-F405LxFEА-K409R) или AAG (BisG1 FER-F405LxAAG-K409R) в другой HC, продемонстрирована также практически полная элиминация повышающей регуляции CD69 на Т-клетках в совместных культурах PBMC (фиг. 19). В противоположность этому, варианты биспецифических антител CD3xHER2, несущие неактивирующие мутации FER в одной HC, в сочетании с другой HC, которая несет неактивирующую мутацию N297G (BisG1 FER-F405LxN297G-K409R), или в сочетании с другой HC-областью с функцией, сходной с функцией дикого типа (BisG1 FER-F405LxK409R), индуцировали остаточную активацию Т-клеток, хотя в меньшей степени по сравнению со сходным с диким типом биспецифическим антителом CD3xHER2 (фиг. 19).

В целом, варианты биспецифических антител, таргетирующих раковый антиген и Т-клетку, с асимметричными неактивирующими мутациями в Fc-области, т.е. с неактивирующими мутациями FER в одной HC и с другой HC, которая несет неактивирующие мутации FEA или AAG, эффективно предупреждали активацию Т-клеток, оцененную по повышающей регуляции CD69, в совместной культуре человеческих PBMC.

Пример 27: Аффинность связывания антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа и их неактивирующих вариантов с человеческими Fcγ-рецепторами, измеренная с помощью биослойной интерферометрии

Представленные в примере 6 данные продемонстрировали, что интродукция неактивирующих мутаций L234F-L235E-G236R (FER) в константную область тяжелой цепи (HC) предупреждала связывание с мономерным внеклеточным доменом (ECD) FcγRIa или димерными ECD человеческого FcγRIIa аллотипа 131H, человеческого FcγRIIa аллотипа 131R, человеческого FcγRIIb, человеческого FcγRIIIa аллотипа 158F и человеческого FcγRIIIa аллотипа 158V, по данным ELISA-анализа.

В настоящем исследовании количественно оценивали аффинность связывания антител дикого типа к человеческому CD20 IgG1-изотипа и их неактивирующих вариантов с мономерными внеклеточными доменами (ECD) человеческих FcγRIa, FcγRIIa аллотипа 131H, FcγRIIb и FcγRIIIa аллотипа 158V с использованием биослойной интерферометрии (BLI) с помощью устройства Octet HTX (фирма FortéBio). Протестированные неактивирующие варианты несли мутации L234F-L235E-D265A, L234F-L235E-G236R или L234A-L235A-P329G. Все стадии осуществляли при 30°C. Для человеческого FcγRIa после адаптации (600 с при 30°C) биосенсоров Ni-NTA (фирма FortéBio, каталожный № 18-5101), а также разведения белков в разбавителе для образцов (фирма FortéBio, каталожный № 18-1104) осуществляли измерение исходного уровня путем инкубации биосенсоров Ni-NTA в разбавителе для образцов в течение 100 с. Затем меченный His человеческий FcγRIa (фирма Sino Biological, 10256-H08S-B, 1 мкг/мл) иммобилизовывали на биосенсорах Ni-NTA в течение 600 с. После измерения исходного уровня (100 с) в разбавителе для образцов определяли ассоциацию (300 с) и диссоциацию (1000 с) антитела дикого типа к человеческому CD20 IgG1-изотипа и его неактивирующих вариантов. Связывание антител с человеческим FcγRIa тестировали с использованием диапазона концентраций 1,56 - 100нМ (для IgG1 дикого типа; 2-кратные разведения) или 15,6 - 1000нМ (для IgG1-L234F-L235E-D265A, IgG1-L234F-L235E-G236R и IgG1-L234A-L235A-P329G; 2-кратные разведения). Данные анализировали с помощью программного обеспечения для анализа данных, версия 11.1 (фирма FortéBio). В целом, записанные данные корректировали

путем вычитания референс-кривой (FcγR на сенсоре, измерение только с разбавителем для образцов), ось Y совмещали с последними 10 с измерений исходного уровня, и применяли межэтапную коррекцию, а также фильтрацию Савицкого-Голея. Для определения  $K_D$  (М), а также  $k_{on}$ (1/Мс) и  $k_{off}$  (1/с) 5 выбирали модель 1:1 с использованием глобальной (полной) подгонки. Величины ответа  $< 0,05$  исключали из анализа. Диссоциацию в течение 400 с применяли в качестве представляющего интерес окна для анализа всех вариантов антител. Оптимальную подгонку определяли по полному значению  $R^2 > 0,99$ , указывающему на значимую корреляцию полученных путем подгонки и 10 экспериментальных данных. Кроме того, глобальная (полная) подгонка основана на подгонке  $>3$  кривых (достоверный анализ). Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SD по 2 независимым повторностям.

Для человеческих FcγRIIa аллотипа 131H, FcγRIIb и FcγRIIIa аллотипа 158V после адаптации (600 с при 30°C) стрептавидиновых (SA) биосенсоров 15 (фирма FortéBio, каталожный № 18-5019), а также разведения белков в разбавителе для образцов (фирма FortéBio, каталожный № 18-1104) осуществляли измерение исходного уровня путем инкубации SA-биосенсоров в разбавителе для образцов в течение 100 с. Затем меченный His биотинилированный человеческий FcγRIIa аллотипа 131H (фирма Sino 20 Biological, 10374-H27H1-B, 1 мкг/мл), FcγRIIb (фирма Sino Biological, 10259-H27H-B, 1 мкг/мл) или FcγRIIIa аллотипа 158V (фирма Sino Biological, 10389-H27H1-B, 3 мкг/мл) иммобилизовывали на SA-биосенсорах в течение 65 с (FcγRIIa или FcγRIIb) или 600 с (FcγRIIIa). После измерения исходного уровня (100 с) в разбавителе для образцов определяли ассоциацию (50 с, FcγRIIa или 25 FcγRIIb; 300 с, FcγRIIIa) и диссоциацию (1000 с) антитела дикого типа к человеческому CD20 IgG1-изотипа и его неактивирующих вариантов. Связывание антител с FcγRIIa аллотипа 131H, FcγRIIb и FcγRIIIa аллотипа 158V тестировали с использованием диапазона концентраций (FcγRIIa, 156,25 - 10000нМ, 2-кратные разведения; FcγRIIb, 250 – 16000нМ, 2-кратные разведения; 30 FcγRIIIa, 125 – 8000нМ, 2-кратные разведения). Данные анализировали с помощью программного обеспечения для анализа данных, версия 11.1 (фирма FortéBio). В целом, записанные данные корректировали путем вычитания референс-кривой (FcγR на сенсоре, измерение только с разбавителем для

образцов), ось Y совмещали с последними 10 с измерений исходного уровня, и применяли межэтапную коррекцию. Из-за низкой аффинности между человеческим IgG1 и низкоаффинными Fcγ-рецепторами FcγRIIa аллотипа 131H, FcγRIIb и FcγRIIIa аллотипа 158V, выбирали анализ в состоянии равновесия (SSA) для определения  $K_D(M)$ . В целом, величины ответа  $< 0,05$  исключали из анализа. Ответы в состоянии равновесия (когда сенсограмма достигала плато на фазе ассоциации) для различных концентраций антитела рассчитывали с использованием функции R-равновесия ( $R_{eq}$ ) с помощью пакета программ анализа данных (Data Analysis Software), после чего строили график зависимости ответов в состоянии равновесия от концентрации антитела и, в завершение, применяли модель Лэнгмюра для расчета  $K_D (M)$ . Подгонку считали оптимальной при полном значении  $R^2 > 0,99$ , свидетельствующем о том, что подгонка значимо коррелирует с экспериментальными данными. Кроме того, SSA основан на подгонке  $> 3$  кривых ассоциации, и построенные графики зависимости ответов в состоянии равновесия для каждой концентрации антитела, достигшие плато, позволяли правильно рассчитывать ответ, представляющий собой максимальный уровень связывания (достоверный анализ). Данные представляют собой средние значения  $\pm SD$  по 2 независимым повторностям.

Оценка связывания вариантов человеческих антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа с человеческими FcγRIa, FcγRIIa аллотипа 131H, FcγRIIb и FcγRIIIa аллотипа 158V с использованием биослойной интерферометрии продемонстрировали, что IgG1 дикого типа связывался со всеми протестированными Fcγ-рецепторами с аффинностью связывания, составляющей 1,8нМ для FcγRIa, 1,9мкМ для FcγRIIa аллотипа 131H, 7,3мкМ для FcγRIIb и 0,6мкМ для FcγRIIIa аллотипа 158V (таблица 18). В противоположность этому, варианты человеческих антител IgG1-изотипа, несущие неактивирующие мутации L234F-L235E-G236R, L234F-L235E-D265A или L234A-L235A-P329G в константной области тяжелой цепи, не связывались с человеческими FcγRIa, FcγRIIa аллотипа 131H, FcγRIIb и FcγRIIIa аллотипа 158V (таблица 18).

Таблица 18: Аффинность связывания человеческих FcγR вариантами антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа, несущими неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, измеренная с помощью биослойной интерферометрии. Для высокоаффинных рецепторов FcγRIa

представленные значения  $K_D$  (М),  $k_{on}$ (1/Мс) и  $k_{off}$  (1/с) получены с помощью модели 1:1 с использованием глобальной (полной подгонки). Для низкоафинных рецепторов FcγRIa аллотипа 131H, FcγRIIb и FcγRIIIa аллотипа 158V, представленные значения  $K_D$  (М) получали с помощью анализа в состоянии равновесия. Данные представляют собой средние значения ± SD по 2 независимым повторностям. Протестированные варианты представляли собой IgG1, IgG1-FER, IgG1-FEA и IgG1-LALAPG, где FER: L234F-L235E-G236R, FEA: L234F-L235E-D265A и LALAPG: L234A-L235A-P329G. SSA: анализ в состоянии равновесия, BLI: биослойная интерферометрия, nb: связывание отсутствует, n/a: неприменимо.

**Таблица 18**

Аффинность связывания с человеческим FcγR (BLI)						
FcγR ↓	Вариант антитела →		IgG1	IgG1-FER	IgG1-FEA	IgG1-LALAPG
FcγRIa (метод глобальной подгонки)	$K_D$ (М)	Среднее значение	1,84E-09	nb	nb	nb
		SD	7,14E-10	n/a	n/a	n/a
	$k_{on}$ (1/Мс)	Среднее значение	3,54E+05	nb	nb	nb
		SD	9,76E+04	n/a	n/a	n/a
	$k_{off}$ (1/с)	Среднее значение	6,16E-04	nb	nb	nb
		SD	7,50E-05	n/a	n/a	n/a
FcγRIIa(H) (SSA)	$K_D$ (М)	Среднее значение	1,90E-06	nb	nb	nb
		SD	4,24E-07	n/a	n/a	n/a
FcγRIIb (SSA)	$K_D$ (М)	Среднее значение	7,30E-06	nb	nb	nb
		SD	9,90E-07	n/a	n/a	n/a
FcγRIIIa(V) (SSA)	$K_D$ (М)	Среднее значение	5,65E-07	nb	nb	nb
		SD	1,20E-07	n/a	n/a	n/a

**Пример 28: Аффинность связывания антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа и их неактивирующих вариантов с мышинными Fcγ-рецепторами, измеренная с помощью биослойной интерферометрии**

В примере 27 представлены данные об аффинности связывания или его отсутствии у антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа и их неактивирующих вариантов с человеческими FcγRIa, FcγRIIa аллотипа 131H, FcγRIIb и FcγRIIIa аллотипа 158V, измеренные с помощью биослойной интерферометрии. Однако при оценке *in vivo* терапевтических действий человеческих антител на мышинных моделях, в зависимости от выбранной мышинной модели, человеческие Fcγ-

рецепторы могут не присутствовать. Вместо этого, оценка терапевтического действия человеческого антитела может зависеть от присутствия эндогенно экспрессируемых мышинных Fc $\gamma$ -рецепторов. В таких случаях, если польза терапевтического антитела определяется неактивирующим Fc-доменом, то  
5 имеющим решающее значение фактом является гарантия отсутствия связывания с мышинными Fc $\gamma$ -рецепторами неактивирующего варианта антитела.

В настоящем исследовании оценивали аффинность связывания антитела дикого типа к человеческому CD20 IgG1-изотипа и его неактивирующих вариантов, несущих мутации L234F-L235E-D265A, L234F-L235E-G236R, L234A-  
10 L235A-P329G, с мономерными внеклеточными доменами (ECD) мышинных Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIb, Fc $\gamma$ RIII и Fc $\gamma$ RIV с использованием биослойной интерферометрии (BLI) с помощью устройства Octet HTX (фирма FortéBio). Все стадии осуществляли при 30°C. Для мышинового Fc $\gamma$ RI после адаптации (600 с при 30°C) биосенсоров Ni-NTA (фирма FortéBio, каталожный № 18-5101), а также разведения белков в  
15 разбавителе для образцов (фирма FortéBio, каталожный № 18-1104) осуществляли измерение исходного уровня путем инкубации биосенсоров Ni-NTA в разбавителе для образцов в течение 100 с. Затем меченный His мышинный Fc $\gamma$ RI (фирма Sino Biological, каталожный № 50086-M27H-B, 2 мкг/мл) иммобилизовывали на биосенсорах Ni-NTA в течение 600 с. После измерения  
20 исходного уровня (100 с) в разбавителе для образцов определяли ассоциацию (300 с) и диссоциацию (1000 с) антитела дикого типа к человеческому CD20 IgG1-изотипа и его неактивирующих вариантов. Связывание антител с мышинным Fc $\gamma$ RI тестировали с использованием диапазона концентраций (1,56 - 1000нМ; 2-кратные разведения). Данные анализировали с помощью программного  
25 обеспечения для анализа данных, версия 11.1 (фирма FortéBio). В целом, записанные данные корректировали путем вычитания референс-кривой (Fc $\gamma$ R на сенсоре, измерение только с разбавителем для образцов), ось Y совмещали с последними 10 с измерений исходного уровня, и применяли межэтапную коррекцию, а также фильтрацию Савицкого-Голея. Для определения  $K_D$  (М), а  
30 также  $k_{on}$  (1/Мс) и  $k_{off}$  (1/с) выбирали модель 1:1 с использованием глобальной (полной) подгонки. Величины ответа < 0,05 исключали из анализа. Диссоциацию в течение 100 с применяли в качестве представляющего интерес окна для анализа всех вариантов антител. Оптимальную подгонку определяли по полному

значению  $R^2 > 0,98$ , указывающему на значимую корреляцию полученных путем подгонки и экспериментальных данных. Кроме того, глобальная (полная) подгонка основана на подгонке  $>3$  кривых (достоверный анализ). Данные представляют собой средние значения  $\pm SD$  по 2 независимым повторностям.

5 Для мышинных Fc $\gamma$ RIIb, Fc $\gamma$ RIII и Fc $\gamma$ RIV после адаптации (600 с при 30°C) стрептавидиновых (SA) биосенсоров (фирма FortéBio, каталожный № 18-5019), а также разведения белков в разбавителе для образцов (фирма FortéBio, каталожный № 18-1104) осуществляли измерение исходного уровня путем инкубации SA-биосенсоров в разбавителе для образцов в течение 100 с. Затем

10 меченный His биотинилированный мышинный Fc $\gamma$ RIIb (фирма Sino Biological, каталожный № 50030-M27H-B, 1 мкг/мл), Fc $\gamma$ RIII (фирма Sino Biological, каталожный № 50326-M27H-B, 1 мкг/мл) или Fc $\gamma$ RIV (фирма Sino Biological, каталожный № 50036-M27H-B, 1 мкг/мл) иммобилизовывали на SA-биосенсорах в течение 90 с (Fc $\gamma$ RIIb) или 250 с (Fc $\gamma$ RIII и Fc $\gamma$ RIV). После измерения

15 исходного уровня (100 с) в разбавителе для образцов определяли ассоциацию (50 с Fc $\gamma$ RIIb или Fc $\gamma$ RIII; 300 с Fc $\gamma$ RIV) и диссоциацию (1000 с) антитела дикого типа к человеческому CD20 IgG1-изотипа и его неактивирующих вариантов. Связывание антител с мышинными Fc $\gamma$ RIIb, Fc $\gamma$ RIII и Fc $\gamma$ RIV тестировали с использованием диапазона концентраций (Fc $\gamma$ RIIb, 187,5 - 12000нМ, 2-кратные

20 разведения; Fc $\gamma$ RIII, 156,25 - 10000нМ, 2-кратные разведения; Fc $\gamma$ RIV, 78,13 - 5000нМ, 2-кратные разведения). Данные анализировали с помощью программного обеспечения для анализа данных, версия 11.1 (фирма FortéBio). В целом, записанные данные корректировали путем вычитания референс-кривой (Fc $\gamma$ R на сенсоре, измерение только с разбавителем для образцов), ось Y

25 совмещали с последними 10 с измерений исходного уровня, и применяли межэтапную коррекцию. Из-за низкой аффинности между человеческим IgG1 и низкоаффинными мышинными Fc $\gamma$ -рецепторами Fc $\gamma$ RIIb, Fc $\gamma$ RIII и Fc $\gamma$ RIV, выбирали анализ в состоянии равновесия (SSA) для определения  $K_D$ (M). В целом, величины ответа  $< 0,05$  исключали из анализа. Ответы в состоянии

30 равновесия (когда сенсограмма достигала плато на фазе ассоциации) для различных концентраций антитела рассчитывали с использованием функции R-равновесия ( $R_{eq}$ ) с помощью пакета программ анализа данных (Data Analysis Software), после чего строили график зависимости ответов в состоянии

равновесия от концентрации антитела и, в завершение, применяли модель Лэнгмюра для расчета  $K_D$  (М). Подгонку считали оптимальной при полном значении  $R^2 > 0,98$ , свидетельствующем о том, что подгонка значимо коррелирует с экспериментальными данными. Кроме того, SSA основан на подгонке  $>3$  кривых ассоциации, и построенные графики зависимости ответов в состоянии равновесия для каждой концентрации антитела, достигшие плато, позволяли правильно рассчитывать ответ, представляющий собой максимальный уровень связывания (достоверный анализ). Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SD по 2 независимым повторностям.

10            Оценка связывания вариантов антител к человеческому CD20 человеческого IgG1-изотипа с мышинными Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIb, Fc $\gamma$ RIII и Fc $\gamma$ RIV с использованием биослойной интерферометрии продемонстрировала, что человеческий IgG1 дикого типа связывался со всеми протестированными мышинными Fc $\gamma$ -рецепторами с аффинностью связывания, составляющей 15    0,12мкМ для Fc $\gamma$ RIa, 2,8мкМ для Fc $\gamma$ RIIb, 7,5мкМ для Fc $\gamma$ RIII и 1мкМ для Fc $\gamma$ RIV (таблица 19). В противоположность этому, варианты человеческих антител IgG1-изотипа, несущие неактивирующие мутации L234F-L235E-G236R, L234F-L235E-D265A или L234A-L235A-P329G в константной области тяжелой цепи, не связывались с мышинными Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIb, Fc $\gamma$ RIII и Fc $\gamma$ RIV (таблица 20    19).

Таблица 19: Аффинность связывания мышинных Fc $\gamma$ R вариантами антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа, несущими неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, измеренная с помощью биослойной интерферометрии. Для высокоаффинного рецептора Fc $\gamma$ RI представленные значения  $K_D$  (М),  $k_{on}$  (1/Мс) и  $k_{off}$  (1/с) получали с помощью модели 1:1 с использованием глобальной (полной подгонки). Для низкоаффинных рецепторов Fc $\gamma$ RIIb, Fc $\gamma$ RIII и Fc $\gamma$ RIV представленное значение  $K_D$  (М) получали с помощью анализа в состоянии равновесия. Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SD по 2 независимым повторностям. Протестированные варианты представляли собой IgG1, IgG1-FER, IgG1-FEA и IgG1-LALAPG, где FER: 25    L234F-L235E-G236R, FEA: L234F-L235E-D265A и LALAPG: L234A-L235A-P329G. SSA: анализ в состоянии равновесия, BLI: биослойная интерферометрия 30    pb: связывание отсутствует, n/a: неприменимо.

Таблица 19

Аффинность связывания с мышиным FcγR (BLI)						
FcγR ↓	Вариант антитела →		IgG1	IgG1-FER	IgG1-FEA	IgG1-LALAPG
FcγRI (метод глобальной подгонки)	$K_D$ (M)	Среднее значение	1,24E-07	nb	nb	nb
		SD	1,34E-08	n/a	n/a	n/a
	$k_{on}$ (1/Мс)	Среднее значение	1,16E+05	nb	nb	nb
		SD	5,66E+03	n/a	n/a	n/a
	$k_{off}$ (1/с)	Среднее значение	1,44E-02	nb	nb	nb
		SD	2,26E-03	n/a	n/a	n/a
FcγRIIb (SSA)	$K_D$ (M)	Среднее значение	2,85E-06	nb	nb	nb
		SD	1,20E-06	n/a	n/a	n/a
FcγRIII (SSA)	$K_D$ (M)	Среднее значение	7,45E-06	nb	nb	nb
		SD	1,06E-06	n/a	n/a	n/a
FcγRIV (SSA)	$K_D$ (M)	Среднее значение	1,04E-06	nb	nb	nb
		SD	8,49E-08	n/a	n/a	n/a

Пример 29: Аффинность связывания антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа и их неактивирующих вариантов с Fcγ-рецепторами обезьян циномогус, измеренная с помощью биослойной интерферометрии

На стадии доклинической разработки могут быть начаты исследования с участием приматов кроме человека (обезьяны циномогус, *Macaca fascicularis*) или эксперименты с использованием биологических образцов, полученных из приматов кроме человека, для изучения терапевтического действия, а также безопасности и фармакокинетики антител, являющихся кандидатами для применения в терапии. В примере 27 представлены данные об аффинности связывания или его отсутствии у антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа и их неактивирующих вариантов с человеческими FcγRIa, FcγRIIa аллотипа 131H, FcγRIIb и FcγRIIIa аллотипа 158V, измеренные с помощью биослойной интерферометрии. Несмотря на сильное сходство последовательностей Fcγ-рецепторов человека и обезьян циномогус, конкретный неактивирующий вариант, который не связывался с человеческими Fcγ-рецепторами, тем не менее, все еще может связываться с Fcγ-рецепторами циномогус. Поэтому для минимизации риска возникновения нежелательных явлений и ограничивающей дозу токсичности оценивали аффинность связывания антитела дикого типа к человеческому CD20 IgG1-изотипа и его неактивирующих вариантов, несущих

мутации L234F-L235E-D265A, L234F-L235E-G236R, L234A-L235A-P329G, с мономерными внеклеточными доменами (ECD) Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIb и Fc $\gamma$ RIII циномоглус с использованием биослойной интерферометрии (BLI) с помощью устройства Octet HTX (фирма FortéBio).

- 5 Все стадии осуществляли при 30°C. Для Fc $\gamma$ RI циномоглус после адаптации (600 с при 30°C) биосенсоров Ni-NTA (фирма FortéBio, каталожный № 18-5101), а также разведения белков в разбавителе для образцов (фирма FortéBio, каталожный № 18-1104) осуществляли измерение исходного уровня путем инкубации биосенсоров Ni-NTA в разбавителе для образцов в течение 100 с.
- 10 Затем меченный His Fc $\gamma$ RI циномоглус (фирма R&D Systems, каталожный № CF9239-Fc, 1 мкг/мл) иммобилизовывали на биосенсорах Ni-NTA в течение 600 с. После измерения исходного уровня (100 с) в разбавителе для образцов определяли ассоциацию (300 с) и диссоциацию (1000 с) антитела дикого типа к человеческому CD20 IgG1-изотипа и его неактивирующих вариантов.
- 15 Связывание антител с Fc $\gamma$ RI циномоглус тестировали с использованием диапазона концентраций 1,56 - 100нМ (для IgG1 дикого типа; 2-кратные разведения) или 15,6 - 1000нМ (для IgG1-L234F-L235E-D265A, IgG1-L234F-L235E-G236R и IgG1-L234A-L235A-P329G; 2-кратные разведения). Данные анализировали с помощью программного обеспечения для анализа данных, версия 11.1 (фирма FortéBio). В целом, записанные данные корректировали
- 20 путем вычитания референс-кривой (Fc $\gamma$ R на сенсоре, измерение только с разбавителем для образцов), ось Y совмещали с последними 10 с измерений исходного уровня. И, наконец, применяли межэтапную коррекцию, а также фильтрацию Савицкого-Голея. Для определения  $K_D$  (М), а также  $k_{on}$ (1/Мс) и  $k_{off}$
- 25 (1/с) выбирали модель 1:1 с использованием глобальной (полной) подгонки. Величины ответа < 0,05 исключали из анализа. Диссоциацию в течение 400 с применяли в качестве представляющего интерес окна для анализа всех вариантов антител. Оптимальную подгонку определяли по полному значению  $R^2$
- 30 >0,98, указывающему на значимую корреляцию полученных путем подгонки данных и экспериментальных данных. Кроме того, глобальная (полная) подгонка основана на подгонке >3 кривых (достоверный анализ). Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SD по 2 независимым повторностям.

Для FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIII циномоглус после адаптации (600 с при 30°C) стрептавидиновых (SA) биосенсоров (фирма FortéBio, каталожный № 18-5019), а также разведения белков в разбавителе для образцов (фирма FortéBio, каталожный № 18-1104) осуществляли измерение исходного уровня путем

5 инкубации SA-биосенсоров в разбавителе для образцов в течение 100 с. Затем меченный His биотинилированный FcγRIIa циномоглус (фирма Sino Biological, каталожный № 90015-C27H-B, 1 мкг/мл), FcγRIIb циномоглус (фирма Sino Biological, каталожный № 90014-C27H-B, 1 мкг/мл) или FcγRIII циномоглус (фирма ACROBiosystems, каталожный № FC6-C82E0, 1 мкг/мл)

10 иммобилизовывали на SA-биосенсорах в течение 80 с (FcγRIIa и FcγRIIb) или 100 с (FcγRIII). После измерения исходного уровня (100 с) в разбавителе для образцов определяли ассоциацию (50 с FcγRIIa или FcγRIIb; 300 с FcγRIII) и диссоциацию (1000 с) антитела дикого типа к человеческому CD20 IgG1-изотипа и его неактивирующих вариантов. Связывание антител с FcγRIIa, FcγRIIb и

15 FcγRIII циномоглус тестировали с использованием диапазона концентраций (FcγRIIa, 156,25 - 10000нМ, 2-кратные разведения; FcγRIIb, 187,5 – 12000нМ, 2-кратные разведения; FcγRIII, 31,25 – 2000нМ, 2-кратные разведения). Данные анализировали с помощью программного обеспечения для анализа данных, версия 11.1 (фирма FortéBio). В целом, записанные данные корректировали

20 путем вычитания референс-кривой (FcγR на сенсоре, измерение только с разбавителем для образцов), ось Y совмещали с последними 10 с измерений исходного уровня, и применяли межэтапную коррекцию. Из-за низкой аффинности между человеческим IgG1 и низкоаффинными Fcγ-рецепторами FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIII циномоглус, выбирали анализ в состоянии равновесия

25 (SSA) для определения  $K_D(M)$ . В целом, величины ответа  $< 0,05$  исключали из анализа. Ответы в состоянии равновесия (когда сенсограмма достигала плато на фазе ассоциации) для различных концентраций антитела рассчитывали с использованием функции R-равновесия ( $R_{eq}$ ) с помощью пакета программ анализа данных (Data Analysis Software), после чего строили график зависимости

30 ответов в состоянии равновесия от концентрации антитела и, в завершение, применяли модель Лэнгмюра для расчета  $K_D (M)$ . Подгонку считали оптимальной при полном значении  $R^2 > 0,98$ , свидетельствующем о том, что подгонка значимо коррелирует с экспериментальными данными. Кроме того,

SSA основан на подгонке  $>3$  кривых ассоциации, и построенные графики зависимости ответов в состоянии равновесия для каждой концентрации антитела, достигшие плато, позволяли правильно рассчитывать ответ, представляющий собой максимальный уровень связывания (достоверный анализ). Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SD по 2 независимым повторностям.

Оценка связывания вариантов антител к человеческому CD20

человеческого IgG1-изотипа с Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIb и Fc $\gamma$ RIII циномоглус с использованием биослойной интерферометрии продемонстрировала, что человеческий IgG1 дикого типа связывался со всеми протестированными Fc $\gamma$ -рецепторами циномоглус с аффинностью связывания, составляющей 0,6нМ для Fc $\gamma$ RIa, 4,3мкМ для Fc $\gamma$ RIIa, 3,9мкМ для Fc $\gamma$ RIIb и 0,4мкМ для Fc $\gamma$ RIII (таблица 20). В противоположность этому, варианты человеческих антител IgG1-изотипа, несущие неактивирующие мутации L234F-L235E-G236R или L234F-L235E-D265A в константной области тяжелой цепи, не связывались с Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIb и Fc $\gamma$ RIII циномоглус (таблица 20). Неактивирующий вариант IgG1-L234A-L235A-P329G не связывался с низкоаффинными рецепторами Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIb и Fc $\gamma$ RIII. В противоположность этому, хотя анализ с использованием глобальной (полной) подгонки оказался неоптимальным (подгонка только 3 кривых концентраций), анализ фактически продемонстрировал наличие остаточного, но значительно более низкого ( $\sim$  в 3500 раз) связывания IgG1-L234A-L235A-P329G с высокоаффинным рецептором Fc $\gamma$ RI с аффинностью связывания, составляющей приблизительно 2,2мкМ (таблица 20).

В целом, установлено, что варианты человеческих антител IgG1-изотипа, несущие неактивирующие мутации L234F-L235E-G236R, не связывались с Fc $\gamma$ R циномоглус, что совпадает с ранее полученными данными для неактивирующего Fc-варианта L234F-L235E-D265A. В противоположность этому, для варианта L234A-L235A-P329G, который не связывался ни с одним из человеческих или мышиных Fc $\gamma$ R, установлено остаточное связывание с Fc $\gamma$ RI циномоглус, не с Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIb или Fc $\gamma$ RIII циномоглус.

Таблица 20: Аффинность связывания Fc $\gamma$ R циномоглус вариантами антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа, несущими неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, измеренная с помощью биослойной интерферометрии. Для высокоаффинного рецептора Fc $\gamma$ RI представленные

значения  $K_D$  (M),  $k_{on}$  (1/Мс) и  $k_{off}$  (1/с) получали с помощью модели 1:1 с использованием глобальной (полной подгонки). Для низкоаффинных рецепторов FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIII представленное значение  $K_D$  (M) получали с помощью анализа в состоянии равновесия. Данные представляют собой средние значения ± SD по 2 независимым повторностям. Протестированные варианты представляли собой IgG1, IgG1-FER, IgG1-FEA и IgG1-LALAPG, где FER: L234F-L235E-G236R, FEA: L234F-L235E-D265A и LALAPG: L234A-L235A-P329G. SSA: анализ в состоянии равновесия, BLI: биослойная интерферометрия, nb: связывание отсутствует, n/a: неприменимо.

10 Таблица 20

Аффинность связывания с FcγR (BLI) обезьян циномольтус						
FcγR ↓	Вариант антитела →		IgG1	IgG1-FER	IgG1-FEA	IgG1-LALAPG
FcγRI (Метод глобальной подгонки)	$K_D$ (M)	Среднее значение	6,26E-10	nb	nb	2,19E-06 <sup>1</sup>
		SD	7,35E-11	n/a	n/a	3,18E-07 <sup>1</sup>
	$k_{on}$ (1/Мс)	Среднее значение	1,23E+05	nb	nb	1,56E+04 <sup>1</sup>
		SD	8,49E+03	n/a	n/a	4,31E+03 <sup>1</sup>
	$k_{off}$ (1/с)	Среднее значение	7,72E-05	nb	nb	3,33E-02 <sup>1</sup>
		SD	1,46E-05	n/a	n/a	4,45E-03 <sup>1</sup>
FcγRIIa (SSA)	$K_D$ (M)	Среднее значение	4,25E-06	nb	nb	nb
		SD	2,19E-06	n/a	n/a	n/a
FcγRIIb (SSA)	$K_D$ (M)	Среднее значение	3,90E-06	nb	nb	nb
		SD	2,83E-07	n/a	n/a	n/a
FcγRIII (SSA)	$K_D$ (M)	Среднее значение	4,15E-07	nb	nb	nb
		SD	3,54E-08	n/a	n/a	n/a

<sup>1</sup> Анализ связывания IgG1-LALAPG с FcγRI – не оптимальный, подгонка <4 кривых с помощью анализа с использованием глобальной (полной) подгонки

15 Пример 30: Влияние генетической последовательности, содержащей или не содержащей кодирующую последовательность С-концевого лизина, на способность антител к человеческому CD20 и их вариантов, содержащих неактивирующие мутации в области тяжелой цепи, индуцировать комплементзависимую цитотоксичность

20 Генетическая последовательность антител IgG-типа кодирует лизин на С-конце тяжелой цепи, который (частично) отщепляется от полученного антитела IgG-типа в культуральной среде или кровотоке карбоксипептидазами (Van den

Bremer и др., MAbs; 7(4), 2015, сс. 672-680), приводя к возможной гетерогенности конечного терапевтического продукта. Кроме того, установлено, что присутствие на НС С-концевого лизина отрицательно влияет на способность индуцировать CDC. В настоящем исследовании изучали способность индуцировать CDC антителами к человеческому CD20, содержащими неактивирующие мутации L234F-L235E-D265A (FEA) или L234F-L235E-G236R (FER) в константной области тяжелой цепи, осуществляя сравнение с вариантами антител, включающих генетическую последовательность, кодирующую С-концевой лизин НС, и вариантов, в которых генетическая последовательность С-концевого лизина НС удалена с помощью рекомбинантной делеции. Теоретически С-концевой лизин мог отщепляться от последних вариантов в процессе производства или после получения.

CDC-анализ *in vitro* осуществляли в целом согласно методу, описанному в примере 3, на клетках Raji с использованием 20% NHS в качестве источника комплемента. В целом, метод состоял в следующем: антитело к человеческому CD20 IgG1-CD20 или его варианты, несущие неактивирующие мутации FEA или FER в константной области тяжелой цепи, тестировали в диапазоне концентраций (конечные концентрации 0,014-10 мкг/мл; 3-кратные разведения) с использованием 50000 клеток Raji/лунку. Определяли количество PI-позитивных клеток в качестве показателя лизиса клеток с помощью устройства Intellicyt iQue screener (фирма Sartorius). Данные анализировали с использованием нелинейной модели зависимости ответа от дозы агониста, и для каждой экспериментальной повторности рассчитывали площадь под кривой (AUC), построенной с использованием преобразованных в log концентраций, с помощью GraphPad PRISM, используя в качестве исходного уровня контроль без антитела, с последующей стандартизацией каждой экспериментальной повторности относительно значения AUC, измеренного для варианта антитела IgG1-CD20 дикого типа (100%). Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM, полученные в 3 независимых экспериментах.

Как показано на фиг. 20, не обнаружено различия в способности индуцировать CDC в отношении клеток Raji между вариантами антител, полученными на основе генетической последовательности, которая либо содержала, либо в ней отсутствовала нуклеотидная последовательность,

кодирующая С-концевой лизин НС. Это установлено как антител IgG1-CD20 дикого типа, так и для вариантов, содержащих неактивирующие мутации FEA или FER.

Пример 31: Активация и передача сигналов через Fcγ-рецепторы антителами к человеческому CD20 и их неактивирующими вариантами с рекомбинантной делецией С-концевого лизина НС

В примере 30 оценивали влияние рекомбинантной делеции в тяжелой цепи (НС) С-концевого лизина (delK) антитела дикого типа к человеческому CD20 IgG1-изотипа и его неактивирующих вариантов на способность индуцировать или ингибировать индукцию CDC. В настоящем исследовании оценивали активацию и передачу сигналов человеческим FcγR с помощью репортерных анализов фирмы Promega с использованием экспрессирующих мишень клеток Raji и репортерной клеточной линии Jurkat, которая экспрессирует указанный FcγR, указанными антителами к человеческому CD20 IgG1-изотипа и их вариантами, описанными в примере 30.

Активацию опосредуемой человеческим FcγR передачи сигналов вариантами антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа, указанными в примере 30, количественно оценивали с использованием репортерных биоанализов (фирма Promega, FcγRIa: каталожный № CS1781C01; FcγRIIa аллотипа 131H: каталожный № G988A; FcγRIIb: каталожный № CS1781E01; FcγRIIIa аллотипа 158V: каталожный № G701A) с помощью экспрессирующих CD20 клеток Raji в качестве клеток-мишеней согласно процедуре, описанной в примере 7. Фоновый люминесцентный сигнал, определенный при применении образцов, содержащих только среду (без клеток Raji, без антител, без эффекторных клеток), вычитали из сигналов всех образцов до осуществления дальнейшего анализа. Данные анализировали с использованием нелинейной модели зависимости ответа от дозы агониста, и для каждой экспериментальной повторности рассчитывали площадь под кривой (AUC), построенной с использованием преобразованных в log концентраций, с помощью GraphPad PRISM (версия 8.4.1, фирма GraphPad Software), используя для определения исходного уровня контрольный образец без антитела (только клетки Raji и эффекторные клетки). В каждом эксперименте значения AUC стандартизовали относительно репортерной активности, обнаруженной для клеток, которые инкубировали с

несвязывающимся контролем IgG1-b12 (0%), и активности IgG1 дикого типа к человеческому CD20 (100%). Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM по двум независимым повторностям.

5 Оценка активации человеческих Fc $\gamma$ R с помощью репортерных анализов фирмы Promega продемонстрировала отсутствие различий в эффективности индукции, опосредуемой Fc $\gamma$ RIa, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIb и Fc $\gamma$ RIIIa активации между  
10 вариантом, в котором С-концевой лизин HC удален с помощью рекомбинантной делеции (IgG1-delK), или вариантом, в котором указанный С-концевой лизин отщеплялся в процессе производства или после получения (IgG1; фиг. 21).  
Кроме того, не выявлено также влияния на способность неактивирующих вариантов L234F-L235E-G236R (FER) и L234F-L235E-D265A (FEA) элиминировать опосредуемую Fc $\gamma$ RIa, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIb и Fc $\gamma$ RIIIa активацию (фиг. 21).

15 В целом, рекомбинантная делеция С-концевого лизина HC в антителе к человеческому IgG1-CD20 и его неактивирующих вариантах не влияла на способность или отсутствие способности у этих антител индуцировать CDC по сравнению с вариантами, в которых С-концевой лизин отщеплялся в процессе производства или после получения.

20 Пример 32: Комплементзависимая цитотоксичность, индуцированная аллотипическими вариантами антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа и их неактивирующими вариантами

В представленных выше примерах способность индуцировать CDC оценивали для вариантов антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа, которые принадлежали к аллотипу IgG1(f). В настоящем исследовании оценивали  
25 способность различных аллотипов антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа и их вариантов, несущих неактивирующие мутации L234F-L235E-G236R или L234F-L235E-D265A в константной области тяжелой цепи (HC).

Осуществляли *in vitro* CDC-анализ, в целом согласно методу, описанному в примере 3, на клетках Raji с использованием 20% NHS в качестве источника  
30 комплемента. Тестировали различные аллотипы вариантов антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа, включая IgG1(fa), IgG1(zax), IgG1(zav), IgG1(za) и IgG1(f). В целом, метод состоял в следующем: аллотипические варианты антител к человеческому CD20 IgG1-изотипа или их варианты,

несущие неактивирующие мутации, тестировали в диапазоне концентраций (конечные концентрации 0,014-10 мкг/ил; 3-кратные разведения) с использованием 50000 клеток Raji/лунку. Определяли количество PI-позитивных клеток в качестве показателя лизиса клеток с помощью устройства Intellicyt iQue screener (фирма Sartorius). Данные анализировали с использованием нелинейной модели зависимости ответа от дозы агониста, и для каждой экспериментальной повторности рассчитывали площадь под кривой (AUC), построенной с использованием преобразованных в log концентраций, с помощью GraphPad PRISM, используя в качестве исходного уровня контроль без антитела, с последующей стандартизацией каждой экспериментальной повторности относительно значения AUC, измеренного для варианта антитела дикого типа IgG1(f)-CD20 (100%). Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM, полученные в 3 независимых экспериментах.

Как показано на фиг. 22, не обнаружено различия в способности индуцировать CDC в отношении клеток Raji между аллотипическими вариантами IgG1 дикого типа. Способность индуцировать CDC значительно снижалась для всех протестированных аллотипов после интродукции неактивирующих мутаций FER или FEA, при этом мутации FER приводили к более сильному подавлению CDC, чем мутации FEA для всех протестированных аллотипов.

Пример 33: Активация и передача сигналов через Fc $\gamma$ -рецепторы антителами к человеческому CD20 и их неактивирующими вариантами с различными аллотипами константных областей IgG1

В примере 32 оценивали влияние интродукции неактивирующих мутаций L234F-L235E-G236R в тяжелую цепь (HC) антител к человеческому CD20 IgG1-типа с различными аллотипами константных областей на способность индуцировать CDC. В настоящем исследовании оценивали активацию и передачу сигналов человеческим Fc $\gamma$ R с помощью репортерных анализов фирмы Promega с использованием экспрессирующих мишень клеток Raji и репортерной клеточной линии Jurkat, которая экспрессирует указанный Fc $\gamma$ R, указанными антителами к человеческому CD20 с различными аллотипами IgG1 и их вариантами, несущими неактивирующие мутации L234F-L235E-G236R или L234F-L235E-D265A в константной области тяжелой цепи.

Активацию опосредуемой человеческим FcγR передачи сигналов вариантами антител к человеческому CD20, указанными в примере 32, количественно оценивали с помощью репортерных биоанализов (фирма Promega, FcγRIa: каталожный № CS1781C01; FcγRIIa аллотипа 131H: каталожный № G988A; FcγRIIb: каталожный № CS1781E01; FcγRIIIa аллотипа 158V: каталожный № G701A) с использованием экспрессирующих CD20 клеток Raji в качестве клеток-мишеней согласно процедуре, описанной в примере 7. Фоновый люминесцентный сигнал, определенный при применении контрольных образцов, содержащих только среду (без клеток Raji, без антител, без эффекторных клеток), вычитали из сигналов всех образцов до осуществления дальнейшего анализа. Данные анализировали с использованием нелинейной модели зависимости ответа от дозы агониста, и для каждой экспериментальной повторности рассчитывали площадь под кривой (AUC), построенной с использованием преобразованных в log концентраций, с помощью GraphPad PRISM (версия 8.4.1, фирма GraphPad Software), используя для определения исходного уровня контрольный образец без антитела (только клетки Raji и эффекторные клетки). В каждом эксперименте значения AUC стандартизовали относительно репортерной активности, обнаруженной для клеток, которые инкубировали с несвязывающимся контролем IgG1-b12 (0%), и активности IgG1(f) дикого типа (100%). Данные представляют собой средние значения ± SEM по двум независимым повторностям.

Оценка опосредуемой FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIIIa активации с использованием репортерных анализов фирмы Promega продемонстрировала, что хотя обнаружены некоторые вариации, все протестированные аллотипические варианты антител дикого типа IgG1-изотипа к человеческому CD20 обладали способностью эффективно осуществлять активацию человеческих FcγR (фиг. 23). Кроме того, интродукция неактивирующих мутаций либо L234F-L235E-G236R, либо L234F-L235E-D265A в константную область тяжелой цепи различных аллотипических вариантов IgG1 эффективно элиминировала опосредуемую FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIIIa активацию (фиг. 23).

В целом, неактивирующие мутации L234F-L235E-G236R эффективно элиминировали опосредуемую FcγR активацию вариантами антител к

человеческому CD20 IgG1-изотипа с различными аллотипами константных областей.

Пример 34: Комплементзависимая цитотоксичность, индуцированная антителами к человеческому CD20 IgG1-, IgG3- и IgG4-изотипа и их неактивирующими вариантами

5 В настоящем исследовании оценивали способность индуцировать CDC после интродукции неактивирующих мутаций L234F-L235E-G236R или L234F-L235E-D265A в HC антител к человеческому CD20 IgG1- или IgG3-изотипа и после интродукции неактивирующих мутаций L235E-G236R или L235E-D265A в 10 HC антитела к человеческому CD20 IgG4-изотипа, которое в естественных условиях имеет фенилаланин (F) в положении 234.

Осуществляли *in vitro* CDC-анализ, в целом согласно методу, описанному в примере 3, на клетках Raji с использованием 20% NHS в качестве источника комплемента. Антитела дикого типа к человеческому CD20 IgG1-, IgG3- 15 (аллотипы IGHG3\*01 и IGHG3\*04 [IgG3rch2]) и IgG4-изотипа сравнивали с их вариантами, несущими указанные выше неактивирующие мутации. В целом, метод состоял в следующем: варианты антител тестировали в диапазоне концентраций (конечные концентрации 0,014-10 мкг/мл; 3-кратные разведения) с использованием 50000 клеток Raji. Определяли количество PI-позитивных 20 клеток в качестве показателя лизиса клеток с помощью устройства Intellicyt iQue screener (фирма Sartorius). Данные анализировали с использованием нелинейной модели зависимости ответа от дозы агониста, и для каждой экспериментальной повторности рассчитывали площадь под кривой (AUC), построенной с использованием преобразованных в log концентраций, с помощью GraphPad 25 PRISM, используя в качестве исходного уровня контроль без антитела, с последующей стандартизацией каждой экспериментальной повторности относительно значения AUC, измеренного для варианта антитела дикого типа IgG1-CD20 (100%). Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM, полученные в 3 независимых экспериментах.

30 Как показано на фиг. 24A, антитело дикого типа к человеческому CD20 IgG1-изотипа индуцировало более сильную CDC, чем оба аллотипа IgG3 дикого типа. Интродукция неактивирующих мутаций L234F-L235E-D265A и L234F-L235E-G236R сильно подавляла способность индуцировать CDC у обоих

вариантов IgG1 и IgG3, при этом самое сильное подавление CDC-активности обнаружено для вариантов, несущих мутации L234F-L235E-G236R. У IgG4 дикого типа обнаружена лишь очень невысокая присущая ему способность индуцировать CDC, которая уже дополнительно не подавлялась путем интродукции неактивирующих мутаций L235E-G236R или L235E-D265A (фиг. 24Б).

В целом, интродукция неактивирующих мутаций L234F-L235E-G236R в антитела к человеческому CD20 подклассов IgG1 и IgG3 снижала способность индуцировать CDC в отношении клеток Raji сильнее, чем неактивирующие мутации L234F-L235E-D265A.

Пример 35: Активация и передача сигналов через Fcγ-рецепторы антителами к человеческому CD20 IgG1-, IgG3- и IgG4-изотипа и их неактивирующими вариантами

В примере 34 способность индуцировать CDC антителами к человеческому CD20 оценивали после интродукции неактивирующих мутаций L234F-L235E-G236R или L234F-L235E-D265A в константную область тяжелой цепи (HC) IgG3 или после интродукции неактивирующих мутаций L235E-G236R или L235E-D265A в константную область HC IgG4, которая в естественных условиях имеет фенилаланин (F) в положении 234. В настоящем исследовании оценивали активацию и передачу сигналов через человеческий FcγR с помощью репортерных анализов фирмы Promega с использованием экспрессирующих мишень клеток Raji и репортерной клеточной линии Jurkat, которая экспрессирует указанный FcγR, антителами к человеческому CD20 IgG1-, IgG3- и IgG4-изотипа и их вариантами, несущими неактивирующие мутации в константной области HC.

Активацию и передачу сигналов человеческим FcγR вариантами антител к человеческому CD20, указанными в примере 34, количественно оценивали с использованием репортерных биоанализов (фирма Promega, FcγRIa: каталожный № CS1781C01; FcγRIIa аллотипа 131H: каталожный № G988A; FcγRIIb: каталожный № CS1781E01; FcγRIIIa аллотипа 158V: каталожный № G701A) с использованием экспрессирующих CD20 клеток Raji в качестве клеток-мишеней согласно процедуре, описанной в примере 7. Фоновый люминесцентный сигнал, определенный при применении контрольных образцов, содержащих только

среду (без клеток Raji, без антител, без эффекторных клеток), вычитали из сигналов всех образцов до осуществления дальнейшего анализа. Данные анализировали с использованием нелинейной модели зависимости ответа от дозы агониста, и для каждой экспериментальной повторности рассчитывали площадь под кривой (AUC), построенной с использованием преобразованных в log концентраций, с помощью GraphPad PRISM (версия 8.4.1, фирма GraphPad Software), используя для определения исходного уровня контрольный образец без антитела (только клетки Raji и эффекторные клетки). В каждом эксперименте значения AUC стандартизовали относительно репортерной активности, обнаруженной для клеток, которые инкубировали с несвязывающимся контролем IgG1-b12 (0%), и активности IgG1 дикого типа (100%). Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM по двум независимым повторностям.

Оценка опосредуемой человеческим Fc $\gamma$ R активации с использованием репортерных анализов фирмы Promega продемонстрировала, что человеческий IgG1 дикого типа эффективно индуцировал опосредуемую Fc $\gamma$ RIa, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIb и Fc $\gamma$ RIIIa активацию (фиг. 25). Оценка опосредуемой Fc $\gamma$ R активации человеческим IgG4 дикого типа при сравнении с IgG1 продемонстрировала повышенную опосредуемую Fc $\gamma$ RIa и Fc $\gamma$ RIIb активацию (фиг. 25А, В), пониженную опосредуемую Fc $\gamma$ RIIa активацию (фиг. 25Б) и отсутствие опосредуемой Fc $\gamma$ RIIIa активации (фиг. 25Г). Оценка опосредуемой Fc $\gamma$ R активации варианта человеческого антитела дикого типа IgG3 аллотипаIGHG3\*01 (IgG3) продемонстрировала отсутствие опосредуемой Fc $\gamma$ RIIa и Fc $\gamma$ RIIb активации (фиг. 25Б, В) и лишь очень небольшую индукцию опосредуемой Fc $\gamma$ RIa и Fc $\gamma$ RIIIa активации (фиг. 25А, Г). В противоположность этому, для варианта человеческого антитела дикого типа IgG3 аллотипаIGHG3\*04 (IgG3rch2) установлена повышенная опосредуемая Fc $\gamma$ RIa, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIb и Fc $\gamma$ RIIIa активация по сравнению с опосредуемой Fc $\gamma$ RIa, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIb и Fc $\gamma$ RIIIa активацией человеческим IgG3 аллотип IGHG3\*01, хотя уровень опосредуемой Fc $\gamma$ R активации Fc $\gamma$ RIa, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIb и Fc $\gamma$ RIIIa все еще оказался более низким по сравнению с человеческим IgG1 дикого типа (фиг. 25). Оценка опосредуемой Fc $\gamma$ RIa, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIb и Fc $\gamma$ RIIIa активации вариантами антител к человеческому CD20 IgG1-, IgG3- или IgG4-изотипа

продемонстрировала, что интродукция неактивирующих мутаций L234F-L235E-G236R или L234F-L235E-D265A (IgG1, IgG3 и IgG3rch2) или интродукция L235E-G236R или L235E-D265A (IgG4) в константную область тяжелой цепи эффективно элиминировала активацию всех протестированных FcγR (фиг. 25).

5 В целом, неактивирующие мутации L234F-L235E-G236R (или L235E-G236R для IgG4) эффективно элиминировали опосредуемую FcγR активацию вариантами антител к человеческому CD20 вне зависимости от того, в константную область тяжелой цепи какого из изоформ IgG1, IgG3 или IgG4 интродуцировали указанные неактивирующие мутации.

10 Пример 36: Аффинность связывания мышинных антител к человеческому CD20 IgG2a-изотипа и их неактивирующих вариантов с человеческими Fcγ-рецепторами, измеренная с помощью биослойной интерферометрии

Доклинические модели ксенотрансплантатов с использованием иммунодефицитных мышей часто применяют при разработке терапевтических концепций на основе опухолеспецифичных антител. Однако для решения более сложных терапевтических вопросов требуется использовать иммунокомпетентных мышей, которые точно отражают биологию и эффективность терапевтического антитела. В таких случаях требуется суррогатное мышинное антитело для обеспечения естественного взаимодействия антитела с мышинными эффекторными молекулами. В то время как в примерах 27-29 оценивали аффинность связывания человеческого антитела IgG1-изотипа и его неактивирующих вариантов с Fcγ-рецепторами человека, мышей и обезьян циномоглус, в настоящем исследовании изучали, может ли интродукция неактивирующих мутаций L234F-L235E-G236R в константную область тяжелой цепи (HC) мышинного антитела IgG2a-изотипа, предупреждать связывание с человеческими FcγR. Оценка аффинности связывания этих вариантов с мышинными FcγR будет описана в примере 37.

В настоящем исследовании оценивали аффинность связывания мышинного антитела дикого типа к человеческому CD20 IgG2a-изотипа и его неактивирующих вариантов, несущих мутации L234A-L235A, L234F-L235E-G236R или L234A-L235A-P329G, с мономерными внеклеточными доменами (ECD) человеческих FcγRIa, FcγRIIa аллотипа 131H, FcγRIIb и FcγRIIIa аллотипа 158V с использованием биослойной интерферометрии (BLI) с помощью

устройства Octet HTX (фирма FortéBio), в основном согласно методу, описанному в примере 27. В целом, метод состоял в следующем: для человеческого FcγRIa после загрузки биосенсоров Ni-NTA человеческим FcγRIa осуществляли измерение исходного уровня (100 с) в образце для разведения.

5 Затем определяли ассоциацию (300 с) и диссоциацию (1000 с) мышиного антитела дикого типа к человеческому CD20 IgG2a-изотипа и его неактивирующих вариантов. Связывание антител с человеческим FcγRIa тестировали с использованием диапазона концентраций 1,56 - 100нМ (для IgG2a дикого типа; 2-кратные разведения) или 1,56 - 1000нМ (для IgG2a-L234A-L235A, 10 IgG2a-L234F-L235E-G236R и IgG2a-L234A-L235A-P329G; 2-кратные разведения). Данные анализировали согласно методу, представленному в примере 27, при этом величины ответа  $< 0,05$  исключали из анализа. Для анализа всех вариантов антител применяли диссоциацию в течение 400 с в качестве представляющего интерес окна за исключением IgG2a-L234A-L235A, для 15 которого применяли диссоциацию в течение 50 с в качестве представляющего интерес окна. Оптимальную подгонку определяли по полному значению  $R^2 > 0,98$ , указывающему на значимую корреляцию полученных путем подгонки и экспериментальных данных. Кроме того, применяли глобальную (полную) подгонку, основанную на подгонке  $>3$  кривых (достоверный анализ). Данные 20 представляют собой средние значения  $\pm SD$  по 2 независимым повторностям.

Оценку связывания с человеческими FcγRIIa аллотипа 131H, FcγRIIb и FcγRIIIa аллотипа 158V осуществляли практически согласно методу, описанному в примере 27. В целом, метод состоял в следующем: после загрузки стрептавидиновых (SA) биосенсоров человеческим FcγRIIa аллотипа 131H, 25 FcγRIIb или FcγRIIIa аллотипа 158V, осуществляли измерение исходного уровня (100 с) в образце для разведения. Затем определяли ассоциацию (50 с, FcγRIIa или FcγRIIb; 300 с, FcγRIIIa) и диссоциацию (1000 с) мышиных антител дикого типа к человеческому CD20 IgG2a-изотипа и их неактивирующих вариантов. Связывание антител с FcγRIIa аллотипа 131H, FcγRIIb и FcγRIIIa аллотипа 158V 30 тестировали с использованием диапазона концентраций (FcγRIIa, 156,25 - 10000нМ, 2-кратные разведения; FcγRIIb, 250 - 16000нМ, 2-кратные разведения; FcγRIIIa, 125 - 8000нМ, 2-кратные разведения). Данные анализировали согласно методу, описанному в примере 27. Из-за низкой

аффинности между мышинным IgG2a и низкоаффинными Fcγ-рецепторами FcγRIIa аллотипа 131H, FcγRIIb и FcγRIIIa аллотипа 158V, выбирали анализ в состоянии равновесия (SSA) для определения  $K_D$ (M). В целом, величины ответа  $< 0,05$  исключали из анализа. Ответы в состоянии равновесия (когда сенсограмма достигала плато на фазе ассоциации) для различных концентраций антитела рассчитывали с использованием функции R-равновесия ( $R_{eq}$ ) с помощью пакета программ анализа данных (Data Analysis Software), после чего строили график зависимости ответов в состоянии равновесия от концентрации антитела и, в завершение, применяли модель Лэнгмюра для расчета  $K_D$  (M). Подгонку считали оптимальной при полном значении  $R^2 > 0,98$ , свидетельствующем о том, что подгонка значимо коррелирует с экспериментальными данными. Кроме того, SSA основан на подгонке  $>3$  кривых ассоциации, и построенные графики зависимости ответов в состоянии равновесия для каждой концентрации антитела, достигшие плато, позволяли правильно рассчитывать ответ, представляющий собой максимальный уровень связывания (достоверный анализ), если не указано иное. Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SD по 2 независимым повторностям.

Оценка связывания вариантов мышинных антител к человеческому CD20 IgG2a-изотипа с человеческими FcγRIa, FcγRIIa аллотипа 131H, FcγRIIb и FcγRIIIa аллотипа 158V с использованием биослойной интерферометрии продемонстрировала, что мышинный IgG2a дикого типа связывался со всеми протестированными Fcγ-рецепторами с аффинностью связывания, составляющей 1,27нМ для FcγRIa, 1,85мкМ для FcγRIIa аллотипа 131H, 17мкМ для FcγRIIb и 1,95мкМ для FcγRIIIa аллотипа 158V (таблица 21). В противоположность этому, варианты мышинных антител IgG2a-изотипа, несущие неактивирующие мутации L234F-L235E-G236R или L234A-L235A-P329G в константной области тяжелой цепи, не связывались с человеческими FcγRIa, FcγRIIa аллотипа 131H, FcγRIIb и FcγRIIIa аллотипа 158V (таблица 21). Установлено, что мышинный IgG2a, несущий неактивирующие мутации L234A-L235A в константной области тяжелой цепи, не связывался с человеческими FcγRIIa аллотипа 131H и FcγRIIb. Указанный анализ продемонстрировал низкое остаточное связывание IgG2a-L234A-L235A с человеческим FcγRIa ( $K_D = 3,6$ мкМ; анализ глобальный (полный) подгонки, основанный на подгонке лишь 3 кривых концентраций) и

человеческим FcγRIIIa аллотипа 158V ( $K_D = 13,8\text{мкМ}$ ; ответы при анализе в состоянии равновесия не достигали плато) (таблица 21).

В целом, интродукция неактивирующих мутаций L234F-L235-G236R в константную область тяжелой цепи мышиного антитела IgG2a-изотипа предупреждала связывание с человеческими FcγRIa, FcγRIIa аллотипа 131H, FcγRIIb и FcγRIIIa аллотипа 158V, аналогично мышиному антителу IgG2a-изотипа, которое несло неактивирующие мутации L234A-L235A-P329G.

Таблица 21: Аффинность связывания человеческих FcγR вариантами мышиных антител к человеческому CD20 IgG2a-изотипа, несущими неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, измеренная с помощью биослойной интерферометрии. Для высокоаффинного рецептора FcγRIa представленные значения  $K_D$  (М),  $k_{on}$  (1/Мс) и  $k_{off}$  (1/с) получены с помощью модели 1:1 с использованием глобальной (полной подгонки). Для низкоаффинных рецепторов FcγRIIa аллотипа 131H, FcγRIIb и FcγRIIIa аллотипа 158V, представленное значение  $K_D$  (М) получали с помощью анализа в состоянии равновесия. Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SD по 2 независимым повторностям. Протестированные варианты представляли собой IgG2a, IgG2a-FER, IgG2a-LALA и IgG2a-LALAPG, где FER: L234F-L235E-G236R, LALA: L234A-L235A и LALAPG: L234A-L235A-P329G. SSA: анализ в состоянии равновесия, BLI: биослойная интерферометрия, nb: связывание отсутствует, n/a: неприменимо.

Таблица 21

Аффинность связывания с человеческим FcγR (BLI)						
FcγR ↓	Вариант антитела →		IgG2a	IgG2a-FER	IgG2a-LALA	IgG2a-LALAPG
FcγRIa (Метод глобальной подгонки)	$K_D$ (М)	Среднее значение	1,27E-09	nb	3,61E-06 <sup>1</sup>	nb
		SD	3,39E-10	n/a	2,47E-07 <sup>1</sup>	n/a
	$k_{on}$ (1/Мс)	Среднее значение	3,11E+05	nb	4,53E+03 <sup>1</sup>	nb
		SD	2,62E+04	n/a	3,85E+02 <sup>1</sup>	n/a
	$k_{off}$ (1/с)	Среднее значение	3,90E-04	nb	1,63E-02 <sup>1</sup>	nb
		SD	7,21E-05	n/a	2,55E-04 <sup>1</sup>	n/a
FcγRIIa(H) (SSA)	$K_D$ (М)	Среднее значение	1,85E-06	nb	nb	nb
		SD	3,54E-07	n/a	n/a	n/a
FcγRIIb (SSA)	$K_D$ (М)	Среднее значение	1,70E-05	nb	nb	nb
		SD	1,41E-06	n/a	n/a	n/a
FcγRIIIa(V) (SSA)	$K_D$ (М)	Среднее значение	1,95E-06	nb	1,17E-05 <sup>2</sup>	nb

Аффинность связывания с человеческим FcγR (BLI)					
FcγR ↓	Вариант антитела →	IgG2a	IgG2a-FER	IgG2a-LALA	IgG2a-LALAPG
	SD	2,12E-07	n/a	8,98E-06 <sup>2</sup>	n/a

<sup>1</sup> Связывание IgG2a-LALA с FcγRIa – анализ не оптимальный, <4 подгонок при анализе с помощью глобальной (полной) подгонки

<sup>2</sup> Связывание IgG2a-LALA с FcγRIIIa(V) – анализ не оптимальный, ответы в анализе в состоянии равновесия не достигали плато

5

Пример 37: Аффинность связывания мышинных антител к человеческому CD20 IgG2a-изотипа и их неактивирующих вариантов с мышинными Fcγ-рецепторами, измеренная с помощью биослойной интерферометрии

10 В примере 36 изучали аффинность связывания неактивирующих мышинных антител к человеческому CD20 IgG2a-изотипа с человеческими FcγR. В настоящем исследовании оценивали, может ли интродукции неактивирующих мутаций L234F-L235E-G236R в константную область тяжелой цепи (HC) мышинного антитела IgG2a-изотипа препятствовать связыванию с мышинными FcγR.

15

Аффинность связывания мышинных антител к человеческому CD20, описанных в примере 36, с мономерными внеклеточными доменами (ECD) мышинных FcγRI, FcγRIIb, FcγRIII и FcγRIV оценивали с использованием биослойной интерферометрии (BLI) с помощью устройства Octet HTX (фирма FortéBio), в основном согласно методу, описанному в примере 28. В целом, метод состоял в следующем: для мышинного FcγRI после загрузки биосенсоров Ni-NTA мышинным FcγRI осуществляли измерение исходного уровня (100 с) в образце для разведения. Затем определяли ассоциацию (300 с) и диссоциацию (1000 с) мышинного антитела дикого типа к человеческому CD20 IgG2a-изотипа и его неактивирующих вариантов, несущих мутации L234A-L235A, L234F-L235E-G236R или L234A-L235A-P329G. Связывание антител с мышинным FcγRI тестировали с использованием диапазона концентраций 1,56 - 100нМ (для IgG2a дикого типа; 2-кратные разведения) или 1,56 - 1000нМ (для IgG2a-L234A-L235A, IgG2a-L234F-L235E-G236R и IgG2a-L234A-L235A-P329G; 2-кратные разведения). Данные анализировали согласно методу, представленному в примере 28, при этом величины ответа < 0,05 исключали из анализа.

20

25

30

Диссоциацию в течение 400 с применяли в качестве представляющего интерес окна для анализа всех вариантов антител. Оптимальную подгонку определяли по

полному значению  $R^2 > 0,98$ , указывающему на значимую корреляцию полученных путем подгонки данных и экспериментальных данных. Кроме того, применяли глобальную (полную) подгонку, основанную на подгонке  $>3$  кривых (достоверный анализ), если не указано иное. Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SD по 2 независимым повторностям.

5 \quad \backslash \quad \text{Оценку аффинности связывания с мышинными Fc\gamma RIIb, Fc\gamma RIII и Fc\gamma RIV осуществляли практически согласно методу, описанному в примере 28. В целом, метод состоял в следующем: после загрузки стрептавидиновых (SA) биосенсоров мышинными Fc\gamma RIIb, Fc\gamma RIII или Fc\gamma RIV, осуществляли измерение исходного

10 уровня (100 с) в образце для разведения. Затем определяли ассоциацию (50 с, Fc\gamma RIIb или Fc\gamma RIII; 300 с, Fc\gamma RIV) и диссоциацию (1000 с) мышинового антитела дикого типа к человеческому CD20 IgG2a-изотипа и его неактивирующих вариантов, несущих мутации L234A-L235A, L234F-L235E-G236R или L234A-L235A-P329G. Связывание антител с мышинными Fc\gamma RIIb, Fc\gamma RIII и Fc\gamma RIV

15 тестировали с использованием диапазона концентраций (Fc\gamma RIIb, 187,5 – 12000нМ, 2-кратные разведения; Fc\gamma RIII, 156,25 – 10000нМ, 2-кратные разведения; Fc\gamma RIV, 15,63 – 1000нМ для IgG2a, IgG2a-L234F-L235E-G236R и IgG2a-L234A-L235A-P329G или 156,3 – 10000нМ для IgG2a-L234A-L235A, 2-кратные разведения). Данные анализировали согласно методу, описанному в

20 примере 28. Из-за низкой аффинности между мышинным IgG2a и низкоаффинными Fc\gamma-рецепторами Fc\gamma RIIb, Fc\gamma RIII и Fc\gamma RIV, выбирали анализ в состоянии равновесия (SSA) для определения  $K_D$ (М). В целом, величины ответа  $< 0,05$  исключали из анализа. Ответы в состоянии равновесия (когда сенсограмма достигала плато на фазе ассоциации) для различных концентраций

25 антитела рассчитывали с использованием функции R-равновесия ( $R_{eq}$ ) с помощью пакета программ анализа данных, после чего строили график зависимости ответов в состоянии равновесия от концентрации антитела и, в завершение, применяли модель Лэнгмюра для расчета  $K_D$  (М). Подгонку считали оптимальной при полном значении  $R^2 > 0,98$ , свидетельствующем о том, что

30 подгонка значимо коррелирует с экспериментальными данными. Кроме того, SSA основан на подгонке  $>3$  кривых ассоциации, и построенные графики зависимости ответов в состоянии равновесия для каждой концентрации антитела, достигшие плато, позволяли правильно ответ, представляющий собой

максимальный уровень связывания (достоверный анализ), если не указано иное. Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SD по 2 независимым повторностям.

Оценка связывания вариантов мышинных антител к человеческому CD20 IgG2a-изотипа с мышинными Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIb, Fc $\gamma$ RIII и Fc $\gamma$ RIV с использованием биослойной интерферометрии продемонстрировала, что мышинный IgG2a дикого типа связывался со всеми протестированными мышинными Fc $\gamma$ -рецепторами с аффинностью связывания, составляющей приблизительно 3,8нМ для Fc $\gamma$ RI, 6,4мкМ для Fc $\gamma$ RIIb, 6,9мкМ для Fc $\gamma$ RIII и 0,15мкМ для Fc $\gamma$ RIV (таблица 22). В противоположность этому, у вариантов мышинных антител IgG2a-изотипа, несущих неактивирующие мутации L234F-L235E-G236R или L234A-L235A-P329G в константной области тяжелой цепи, не обнаружено связывание с мышинными Fc $\gamma$ RIIb, Fc $\gamma$ RIII и Fc $\gamma$ RIV (таблица 22). Кроме того, аффинность связывания IgG2a-L234F-L235E-G236R или IgG2a-L234A-L235A-P329G с мышинным Fc $\gamma$ RI значительно снижалась (в 100 раз) по сравнению с IgG2a дикого типа, хотя анализ не был оптимальным (<4 подгонок при анализе с помощью глобальной (полной) подгонки) (таблица 22). Мышиное антитело IgG2a-L234A-L235A не связывалось с мышинными Fc $\gamma$ RIIb и Fc $\gamma$ RIII, но для него обнаружено невысокое остаточное связывание с мышинным Fc $\gamma$ RI (снижение в 100-150 раз по сравнению с wt IgG2a) и Fc $\gamma$ RIV (снижение в 100 раз по сравнению с wt IgG2a) (таблица 22).

В целом, для варианта мышинового антитела IgG2a-изотипа, несущего неактивирующие мутации L234F-L235E-G236R, установлено отсутствие связывания (Fc $\gamma$ RIIb, Fc $\gamma$ RIII и Fc $\gamma$ RIV) или значительно уменьшенное связывание (Fc $\gamma$ RI) с мышинными Fc $\gamma$ R, сходное со связыванием мышинового антитела IgG2a-изотипа, несущего неактивирующие мутации L234A-L235A-P329G.

Таблица 22: Аффинность связывания мышинных Fc $\gamma$ R вариантами мышинных антител к человеческому CD20 IgG2a-изотипа, несущими неактивирующие мутации в константной области тяжелой цепи, измеренная с помощью биослойной интерферометрии. Для высокоаффинного рецептора Fc $\gamma$ RI представленные значения  $K_D$  (М),  $k_{on}$  (1/Мс) и  $k_{off}$  (1/с) получены с помощью модели 1:1 с использованием глобальной (полной подгонки). Для низкоаффинных

рецепторов FcγRIIb, FcγRIII и FcγRIV представленное значение  $K_D$  (M) получали с помощью анализа в состоянии равновесия. Данные представляют собой средние значения ± SD по 2 независимым повторностям. Протестированные варианты представляли собой IgG2a, IgG2a-FER, IgG2a-LALA и IgG2a-LALAPG, где FER: L234F-L235E-G236R, LALA: L234A-L235A и LALAPG: L234A-L235A-P329G. SSA: анализ в состоянии равновесия, BLI: биослойная интерферометрия, nb: связывание отсутствует, n/a: неприменимо.

Таблица 22

Аффинность связывания с мышиным FcγR (BLI)						
FcγR ↓	Вариант антитела →		IgG2a	IgG2a-FER	IgG2a-LALA	IgG2a-LALAPG
FcγRI (Метод глобальной подгонки)	$K_D$ (M)	Среднее значение	3,82E-09	4,30E-07 <sup>1</sup>	2,38E-07	3,64E-07 <sup>1</sup>
		SD	8,49E-11	2,26E-08 <sup>1</sup>	1,06E-08	1,48E-08 <sup>1</sup>
	$k_{on}$ (1/Мс)	Среднее значение	1,62E+05	5,30E+03 <sup>1</sup>	9,73E+03	5,50E+03 <sup>1</sup>
		SD	1,41E+03	4,17E+02 <sup>1</sup>	1,84E+02	2,19E+02 <sup>1</sup>
	$k_{off}$ (1/с)	Среднее значение	6,19E-04	2,27E-03 <sup>1</sup>	2,31E-03	2,00E-03 <sup>1</sup>
		SD	8,49E-06	5,66E-05 <sup>1</sup>	5,66E-05	1,63E-04 <sup>1</sup>
FcγRIIb (SSA)	$K_D$ (M)	Среднее значение	6,40E-06	nb	nb	nb
		SD	8,49E-07	n/a	n/a	n/a
FcγRIII (SSA)	$K_D$ (M)	Среднее значение	6,90E-06	nb	nb	nb
		SD	9,90E-07	n/a	n/a	n/a
FcγRIV (SSA)	$K_D$ (M)	Среднее значение	1,45E-07	nb	1,38E-05 <sup>2</sup>	nb
		SD	2,12E-08	n/a	1,03E-05 <sup>2</sup>	n/a

10 <sup>1</sup> Связывание IgG2a- FER и-LALAPG LALA с FcγRI – анализ не оптимальный, <4 подгонок при анализе с помощью глобальной (полной) подгонки

<sup>2</sup> Связывание IgG2a-LALA с FcγRIV – анализ не оптимальный, ответы в анализе в состоянии равновесия не достигали плато

15 **Пример 38: Активация и передача сигналов через человеческие Fcγ-рецепторы мышиными антителами к человеческому CD20 IgG2a-изотипа и их неактивирующими вариантами**

В примере 36 продемонстрировано, что интродукция неактивирующих мутаций L234F-L235E-G236R в константную область тяжелой цепи (HC) мышиного антитела IgG2a-изотипа эффективно предупреждала связывание с  
20 человеческими FcγRIa, FcγRIIa аллотипа 131H, FcγRIIb и FcγRIIIa аллотипа 158V, по данным, полученным с помощью биослойной интерферометрии. Однако в таких анализах воздействия связанной с антигеном

опосредованной мишенью кластеризации антител и последующей  
опосредованной мишенью кластеризации Fc-рецепторов на эффекторных  
клетках, не были изучены. В настоящем исследовании оценивали активацию и  
передачу сигналов через человеческий FcγR с помощью репортерных анализов  
5 фирмы Promega с использованием экспрессирующих мишень клеток Raji и  
репортерной клеточной линии Jurkat, которая экспрессирует указанный FcγR,  
мышиним антителом дикого типа к человеческому CD20 IgG2a-изотипа и его  
вариантами, несущими неактивирующие мутации L234F-L235E-G236R, L234A-  
L235A или L234A-L235A-P329G в константной области тяжелой цепи.

10 Активацию и передачу сигналов человеческим FcγR вариантами мышинных  
антител к человеческому CD20 IgG2a-изотипа, указанными выше, количественно  
оценивали с использованием репортерных биоанализов (фирма Promega, FcγRIa:  
каталожный № CS1781C01; FcγRIIa аллотипа 131H: каталожный № G988A;  
FcγRIIb: каталожный № CS1781E01; FcγRIIIa аллотипа 158V: каталожный №  
15 G701A) с использованием экспрессирующих CD20 клеток Raji в качестве  
клеток-мишеней согласно процедуре, описанной в примере 7. Фоновый  
люминесцентный сигнал, определенный при применении контрольных образцов,  
содержащих только среду (без клеток Raji, без антител, без эффекторных  
клеток), вычитали из сигналов всех образцов до осуществления дальнейшего  
20 анализа. Данные анализировали с использованием нелинейной модели  
зависимости ответа от дозы агониста, и для каждой экспериментальной  
повторности рассчитывали площадь под кривой (AUC), построенной с  
использованием преобразованных в log концентраций, с помощью GraphPad  
PRISM (версия 8.4.1, фирма GraphPad Software), используя для определения  
25 исходного уровня контрольный образец без антитела (только клетки Raji и  
эффекторные клетки). В каждом эксперименте значения AUC стандартизовали  
относительно репортерной активности, обнаруженной для клеток, которые  
инкубировали с несвязывающимся контролем IgG2a-b12 (0%), и активности  
IgG2a-CD20 дикого типа (100%). Данные представляют собой средние значения  
30 ± SEM по двум независимым повторностям.

Оценка опосредуемой человеческими FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIIIa  
активации с помощью репортерных анализов фирмы Promega  
продемонстрировала, что интродукция неактивирующих мутаций L234F-L235E-

G236R в константную область тяжелой цепи мышиноного антитела IgG2a-изотипа эффективно ингибировала опосредуемую FcγR активацию, сопоставимую с неактивирующим вариантом IgG2a L234A-L235A-P329G (фиг. 26). Отсутствие опосредуемой FcγR активации обнаружено также для IgG2a-L234A-L235A (фиг. 26Б-Г), за исключением частичной активации, опосредуемой FcγRIa (фиг. 26А), что согласуется с небольшим остаточным связыванием IgG2a-L234A-L235A с человеческим FcγRIa, установленным с помощью биослойной интерферометрии (пример 36).

В целом, интродукция неактивирующих мутаций L234F-L235E-G236R в константную область тяжелой цепи мышиноного антитела к человеческому CD20 IgG2a-изотипа эффективно элиминировала опосредуемую человеческим FcγR активацию, сопоставимую с неактивирующим вариантом антитела IgG2a-L234A-L235A-P329G.

Пример 39: Связывание C1q и комплементзависимая цитотоксичность, индуцированная мышинными антителами к человеческому CD20 IgG2a-изотипа и их неактивирующими вариантами

В предыдущих примерах продемонстрировано, что интродукция неактивирующих мутаций L234F-L235E-G236R (FER) в константную область тяжелой цепи (HC) человеческого антитела к человеческому CD20 IgG1-изотипа приводила к практически полной элиминации способности контактировать с фактором комплемента C1q, а также способности индуцировать CDC. В настоящем исследовании оценивали способность мышиноного антитела дикого типа к человеческому CD20 IgG2a-изотипа и его неактивирующих вариантов, несущих мутации FER, L234A-L235A или L234A-L235A-P329G в HC, связываться с человеческим фактором комплемента C1q, а также способность индуцировать CDC.

Мышиное антитело дикого типа к человеческому CD20 IgG2a-изотипа и его неактивирующие варианты, несущие мутации HC, указанные выше, тестировали с помощью анализа C1q-связывания на клетках Raji ( $3 \times 10^4$  клеток/лунку) с использованием диапазона концентраций (конечные концентрации 0,0024 – 10 мкг/мл; 4-кратные разведения) с использованием 20%-ной нормальной человеческой сыворотки (NHS, M0008, фирма Sanquin) в качестве источника C1q, согласно процедуре, описанной в примере 4. Связывание C1q с вариантами

антител оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием устройства Intellicyt iQue screener (фирма Sartorius) путем измерения медианной интенсивности флуоресценции FITC. Данные анализировали с использованием нелинейной модели зависимости ответа от дозы агониста и для каждой экспериментальной повторности рассчитывали площадь под кривой (AUC), построенной с использованием преобразованных в log концентраций, с помощью GraphPad PRISM (версия 8.4.1, фирма GraphPad Software), используя для определения исходного уровня контроль без антитела, с последующей стандартизацией для каждой экспериментальной повторности относительно значения AUC, измеренного для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12 (0%), и значения AUC, измеренного для варианта антитела дикого типа к человеческому CD20 IgG2a-изотипа (100%). Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM, полученные в трех независимых экспериментах.

Те же варианты антител, которые применяли в анализе C1q-связывания, тестировали с помощью *in vitro* CDC-анализа. Варианты антител тестировали в диапазоне концентраций (конечные концентрации 0,0024 -10 мкг/мл; 4-кратные разведения) с использованием  $3 \times 10^4$  клеток Raji на лунку, практически согласно методу, описанному также в примере 3. Определяли количество PI-позитивных клеток с помощью проточной цитометрии с использованием устройства Intellicyt iQue screener (фирма Sartorius). Процент PI-позитивных клеток, который соответствует проценту лизированных клеток, рассчитывали как: (количество PI-позитивных клеток / общее количество клеток)  $\times$  100%. Данные анализировали с использованием нелинейной модели зависимости ответа от дозы агониста, и для каждой экспериментальной повторности рассчитывали площадь под кривой (AUC), построенной с использованием преобразованных в log концентраций, с помощью GraphPad PRISM (версия 8.4.1, фирма GraphPad Software), используя для определения исходного уровня контроль без антитела, с последующей стандартизацией каждой экспериментальной повторности относительно значения AUC, измеренного для несвязывающегося контрольного антитела IgG2a-b12 (0%), и значения AUC, измеренного для варианта антитела дикого типа к человеческому CD20 IgG2a-изотипа (100%). Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM, полученные в трех независимых экспериментах.

### Оценка связывания C1q с мышинными вариантами IgG2a-CD20

продемонстрировала, что IgG2a-CD20 дикого типа эффективно контактировал с белком комплемента C1q после связывания с CD20 на клетка-мишенях Raji (фиг. 27). Неактивирующий вариант, несущий мутации L234A-L235A-P329G в HC, эффективно элиминировал связывание с белком комплемента C1q (фиг. 27).  
5 Однако после интродукции неактивирующих мутаций L234F-L235E-G236R или L234A-L235A в HC мышинового антитела IgG2a-изотипа обнаружено остаточное связывание с C1q (фиг. 27).

При оценке способности индуцировать CDC у этих же вариантов IgG2a-CD20 получали результаты, согласующиеся с результатами, полученными при  
10 оценке C1q- связывания. Интродукция неактивирующих мутаций L234A-L235A-P329G в HC мышинового антитела IgG2a-изотипа приводила к практически полной элиминации способности индуцировать CDC (фиг. 28). Кроме того, интродукция неактивирующих мутаций L234F-L235E-G236R или L234A-L235A в HC  
15 мышинового антитела IgG2a-изотипа приводила к снижению CDC, однако остаточная CDC все еще была обнаружена (фиг. 28).

В целом, интродукция неактивирующих мутаций L234F-L235E-G236R в мышинное антитело IgG2a-изотипа приводила к снижению, но не полному ингибированию способности контактировать с фактором комплемента C1q, а  
20 также способности индуцировать CDC. Таким образом, можно сделать заключение о том, что интродукция неактивирующих мутаций FER снижала способность вступать в контакт с человеческим C1q и индуцировать CDC как у человеческих, так и у мышинных антител IgG-изотипа.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белок, содержащий первый полипептид и второй полипептид, в котором  
указанный первый и второй полипептид каждый содержит по меньшей мере  
5 шарнирную область, СН2-участок и СН3-участок соответственно тяжелой цепи  
человеческого иммуноглобулина IgG1, в котором по меньшей мере один из  
указанных первого и второго полипептидов является модифицированным и  
содержит замену аминокислот, соответствующих аминокислотам в положениях  
L234, L235 и G236, где положения аминокислот определены согласно Eu-  
10 нумерации.

2. Белок по п. 1, в котором аминокислоты в положениях L234, L235 и G236  
по меньшей мере в одном из указанных первом и втором полипептидов  
заменены на F, E и R соответственно.

15 3. Белок по п. 1 или п. 2, в котором один из первого и второго  
полипептидов содержит указанную замену аминокислот, соответствующих  
аминокислотам в положениях L234, L235 и G236, а другой является  
модифицированным и содержит замену аминокислот, соответствующих  
20 аминокислотам в положениях L234, L235 и D265, в котором предпочтительно,  
указанные замены представляют собой F, E и A соответственно.

4. Белок по п. 1 или п. 2, в котором и первый, и второй полипептиды оба  
содержат указанную замену аминокислот, соответствующих аминокислотам  
25 L234, L235 и G236.

5. Белок по одному из п.п. 1-4, в котором каждый из указанных первого и  
второго полипептидов содержит СН1-участок иммуноглобулина.

30 6. Белок по одному из п.п. 1-5, где указанный белок содержит первую и  
вторую связывающую область.

7. Белок по п. 6, в котором указанные первая и вторая связывающие области содержат соответственно переменную область первой тяжелой цепи иммуноглобулина и переменную область первой легкой цепи иммуноглобулина, и в котором указанная вторая связывающая область содержит 5 переменную область второй тяжелой цепи иммуноглобулина и переменную область второй легкой цепи иммуноглобулина.

8. Белок по п. 7, в котором указанные переменные области тяжелых и легких цепей иммуноглобулина представляют собой человеческие или 10 гуманизированные переменные области тяжелых и легких цепей иммуноглобулина.

9. Белок по п. 7 или п. 8, в котором указанные первый и второй полипептиды представляют собой тяжелые цепи иммуноглобулина и в котором 15 указанные первый и второй полипептиды содержат соответственно указанные переменные области первой и второй тяжелых цепей иммуноглобулина.

10. Белок по одному из п.п. 6-9, где указанный белок содержит константную область первой легкой цепи иммуноглобулина и константную 20 область второй легкой цепи иммуноглобулина.

11. Белок по п. 10, где указанный белок содержит первую и вторую легкие цепи иммуноглобулина, где указанные легкие цепи иммуноглобулина содержат соответственно указанные переменные области первой и второй легких цепей 25 иммуноглобулина и соответственно указанные константные области первой и второй легких цепей иммуноглобулина.

12. Белок по п. 11, в котором указанная первая легкая цепь иммуноглобулина соединена с указанной первой тяжелой цепью 30 иммуноглобулина через дисульфидные мостики и указанная вторая легкая цепь иммуноглобулина соединена с указанной второй тяжелой цепью иммуноглобулина через дисульфидные мостики, образуя тем самым указанную первую связывающую область и указанную вторую связывающую область

соответственно, и в котором указанные первая и вторая тяжелые цепи иммуноглобулина соединены через дисульфидные мостики.

13. Белок по одному из п.п. 1-12, который представляет собой антитело.

5

14. Белок по одному из п.п. 4-12, который представляет собой моноспецифическое антитело.

10

15. Белок по п.п. 4-14, в котором указанные первая и вторая полипептидные цепи имеют идентичную аминокислотную последовательность.

15

16. Белок по п. 15, в котором указанные первый и второй полипептиды содержат дополнительную аминокислотную замену, предпочтительно замену аминокислоты, выбранной из группы, которая состоит из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409, такую как F405L или K409R.

20

17. Белок по одному из п.п. 14-16, где указанное моноспецифическое антитело связывается с антигеном, выбранным из группы, которая состоит из клеточных мишеней, цитокинов, токсинов, патогенов, раковых антигенов, белков плазмы.

18. Белок по одному из п.п. 1-13, где указанный белок представляет собой биспецифическое антитело.

25

19. Биспецифическое антитело по п. 18, в котором указанные первый и второй полипептиды содержат дополнительные замены в указанных СН<sub>2</sub>- и СН<sub>3</sub>-участках соответственно, в результате последовательности СН<sub>2</sub>- и СН<sub>3</sub>-участков соответственно указанных первого и второго полипептидов являются различными, указанные замены обеспечивают получение указанного полипептида, который содержит указанные первый и второй полипептиды.

30

20. Биспецифическое антитело по п. 19, в котором в указанном первом полипептиде по меньшей мере одна из аминокислот в положениях,

соответствующих положению, выбранному из группы, которая состоит из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1, заменена и в указанном втором полипептиде по меньшей мере одна из аминокислот в положениях, соответствующих положению, выбранному из группы, которая состоит из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1, заменена, и в котором указанные замены в указанном первом и указанном втором полипептидах не находятся в одинаковых положениях.

10 21. Биспецифическое антитело по п. 19, в котором аминокислота в положении, соответствующем F405, представляет собой L в указанном первом полипептиде, а аминокислота в положении, соответствующем K409, представляет собой R в указанном втором полипептиде, или наоборот.

15 22. Биспецифическое антитело по одному из п.п. 18-21, в котором указанное биспецифическое антитело имеет модификации и в указанном первом, и в указанном втором полипептиде, состоящие из замен аминокислот в положениях L234, L235 и G236 на F, E и R и замен аминокислот в положении F405 на L в указанном первом полипептиде и K409 на R в указанном втором полипептиде, или наоборот.

20 23. Биспецифическое антитело по одному из п.п. 18-22, в котором указанные первый и второй полипептиды имеют замены, состоящие из замен, указанных в одном из п.п. 1-4 и 19-22.

25 24. Белок по одному из п.п. 1-17 или биспецифическое антитело по одному из п.п. 18-23, в котором указанные первый и второй полипептиды содержат аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, где указанная аминокислотная последовательность, которая содержится в указанных первом и втором полипептидах, имеет аминокислотные замены, указанные в п.п. 1-4 и 18-22.

30

25. Белок или биспецифическое антитело по п. 24, в котором указанная аминокислотная последовательность, представленная в SEQ ID NO: 1, не содержит концевой лизин.

5 26. Биспецифическое антитело по одному из п.п. 18-25, в котором одна из указанных связывающих областей связывается с раковым антигеном.

10 27. Биспецифическое антитело по одному из п.п. 18-25, в котором одна из указанных связывающих областей связывается с эффекторной клеткой, такой как Т-клетка, НК-клетка, дендритная клетка, моноцит, макрофаг или нейтрофил.

15 28. Биспецифическое антитело по одному из п.п. 18-25, в котором одна из указанных связывающих областей связывается с эффекторной клеткой, такой как Т-клетка, НК-клетка, дендритная клетка, моноцит, макрофаг или нейтрофил, а другая связывающая область связывается с раковым антигеном.

20 29. Нуклеиновая кислота, кодирующая указанный первый или второй полипептид по одному из п.п. 4-17 и 24-25, где указанный первый или второй полипептид содержит указанную замену аминокислот, соответствующих аминокислотам L234, L235 и G236, где предпочтительно указанные замены в положениях L234, L235 и G236 представляют собой замены на F, E и R соответственно.

25 30. Нуклеиновая кислота по п. 29, где указанный первый или второй полипептид представляет собой тяжелую цепь иммуноглобулина.

31. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 29 или п. 30.

30 32. Фармацевтическая композиция, содержащая белок по одному из п.п. 1-17 или биспецифическое антитело по одному из п.п. 18-28 и фармацевтически приемлемый носитель.

33. Белок по одному из п.п. 1-17 или биспецифическое антитело по одному из п.п. 18-28, или фармацевтическая композиция по п. 32, предназначенные для применения для лечения заболевания.

5 34. Белок, биспецифическое антитело или фармацевтическая композиция для применения по п. 33, где указанное применение включает лечение рака, инфекционного заболевания или аутоиммунного заболевания.

10 35. Способ лечения, включающий введение субъекту белка по одному из п.п. 1-17 или биспецифического антитела по одному из п.п. 18-28, или фармацевтической композиции по п. 32.

36. Способ лечения по п. 35, в котором субъект страдает заболеванием, таким как рак, инфекционное заболевание или аутоиммунное заболевание.

15

37. Способ получения биспецифического антитела, включающий

е) получение первого антитела, которое содержит

а. тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую по меньшей мере шарнирную область, СН2-участок и СН3-участок соответственно тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина IgG1, которая содержит замены аминокислот в положениях L234, L235 и G236 на F, E и R соответственно,

20

б. легкую цепь иммуноглобулина;

ж) получение второго антитела, которое содержит

а. тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую по меньшей мере шарнирную область, СН2-участок и СН3 участок соответственно тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина IgG1, которая содержит замены аминокислот в - положениях L234, L235 и D265, где предпочтительно указанные замены представляют собой F, E и A соответственно,

25

или

- содержит замены аминокислот в положениях L234, L235 и G236 на F, E и R соответственно,

30

б. легкую цепь иммуноглобулина;

з) где последовательности указанных первого и второго СНЗ-участков в указанных соответствующих первом и втором антителах являются различными и являются такими, что гетеродимерное взаимодействие между указанным первым и вторым СНЗ-участками сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанного первого и второго СНЗ-участков;

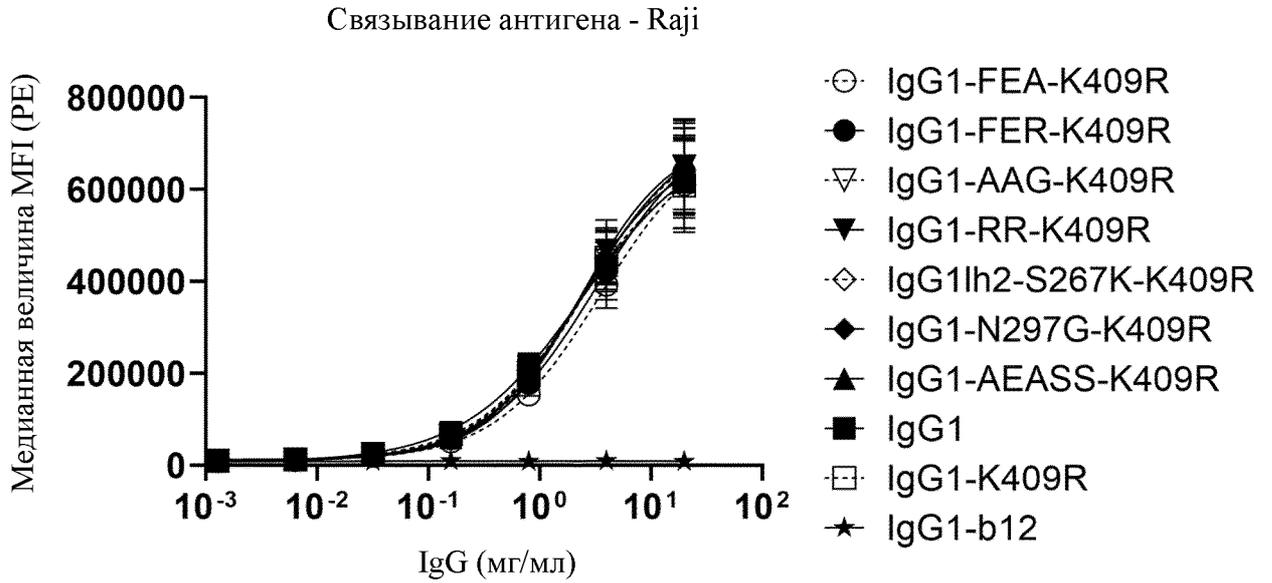
и) инкубацию указанного первого антитела с указанным вторым антителом в восстанавливающих условиях, достаточных для того, чтобы обеспечивать изомеризацию цистеинов в шарнирных областях по дисульфидной связи; и

к) получение указанного биспецифического антитела, содержащего указанную первую тяжелую цепь иммуноглобулина и указанную первую легкую цепь иммуноглобулина указанного первого антитела и указанную вторую тяжелую цепь иммуноглобулина и указанную вторую легкую цепь иммуноглобулина указанного второго антитела.

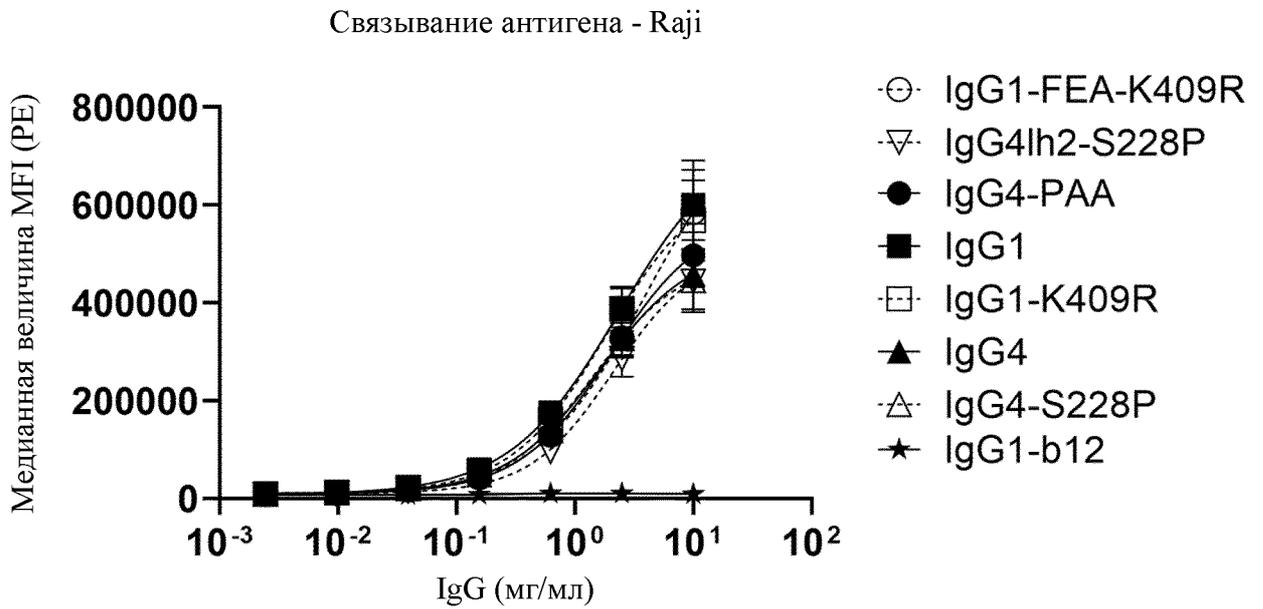
38. Способ по п. 37, в котором на стадии в) указанные различия в последовательности соответствуют указанным в одном из п.п. 19-25.

39. Способ по п. 37 или п. 38, предназначенный для получения биспецифического антитела по одному из п.п. 18-28.

**А**

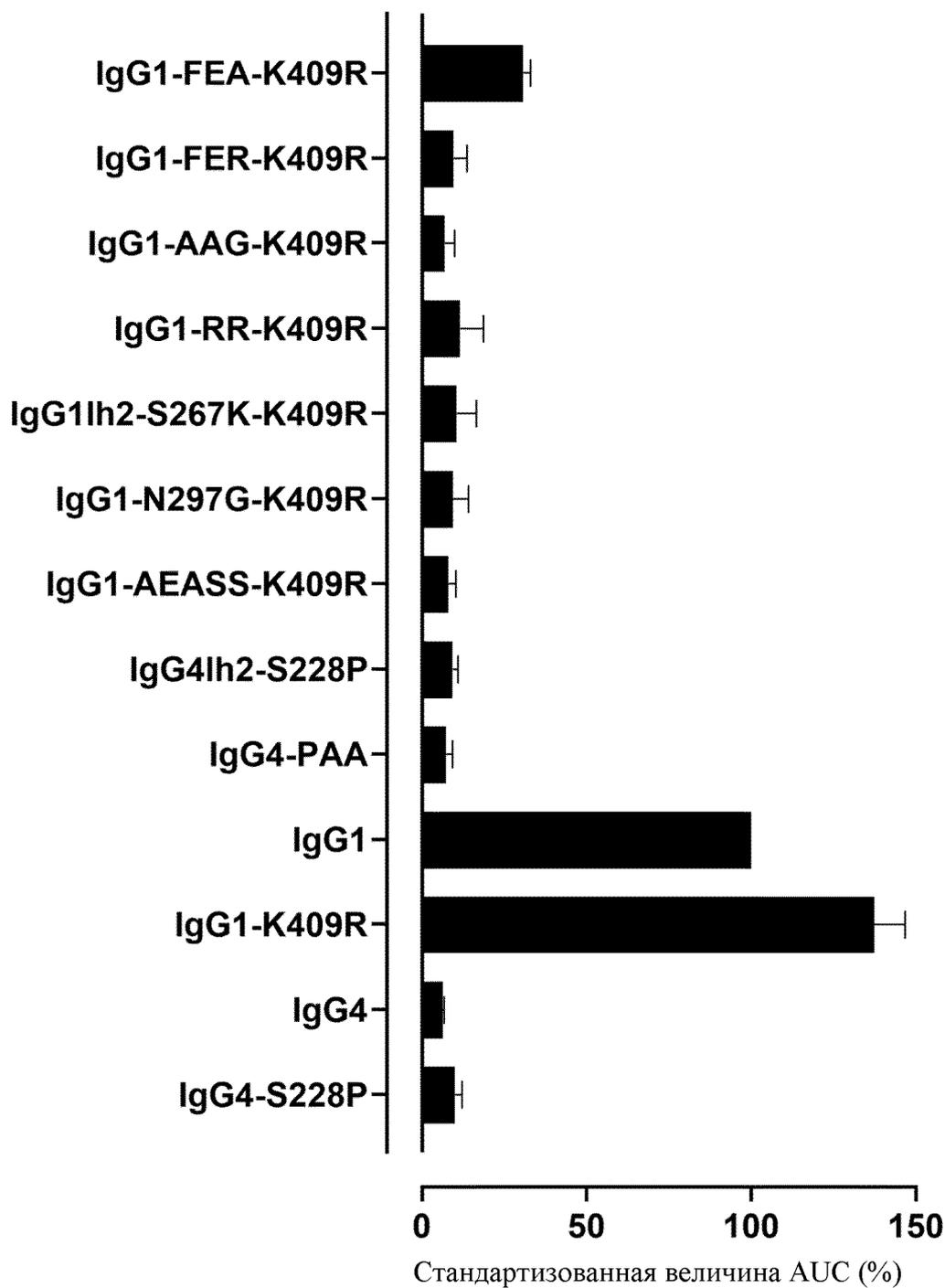


**Б**



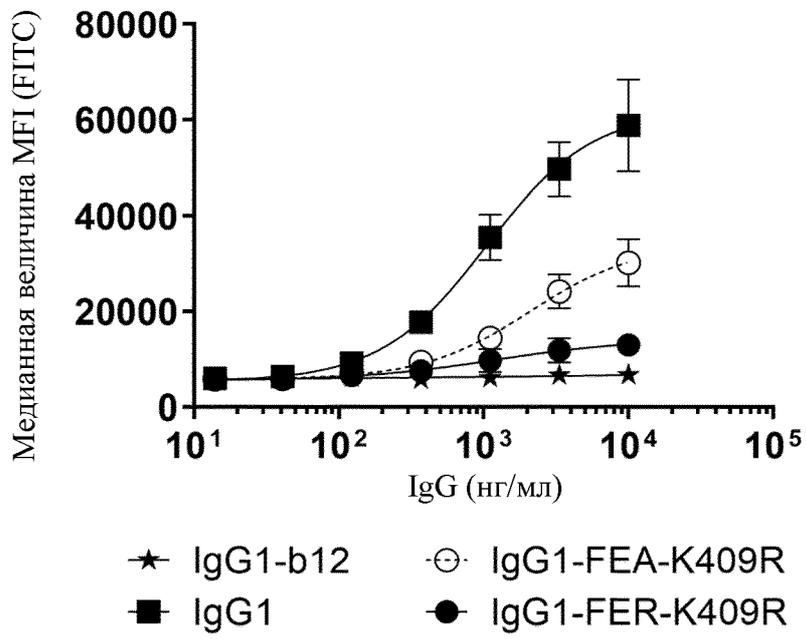
**Фиг. 1**

CDC - Raji

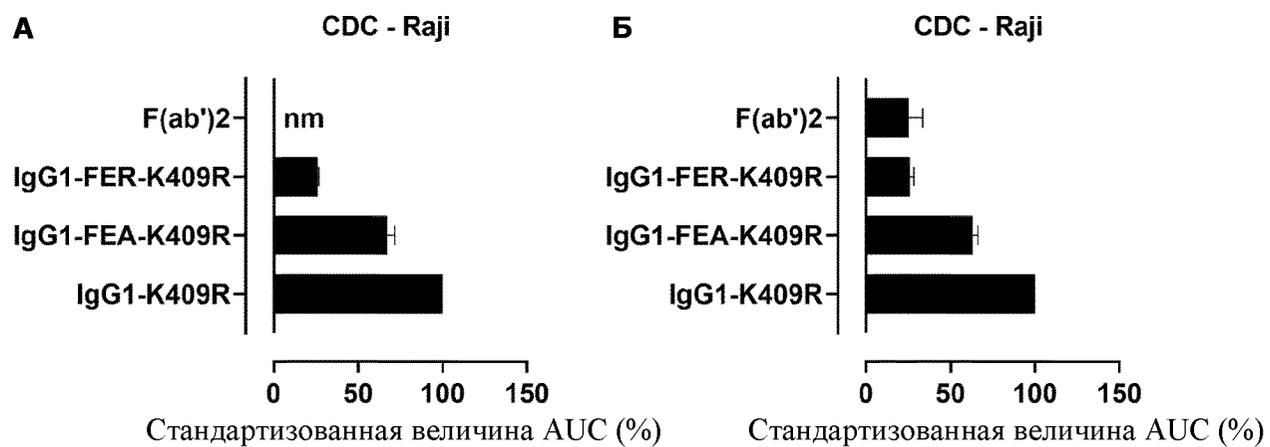


Фиг. 2

Связывание C1q - Raji

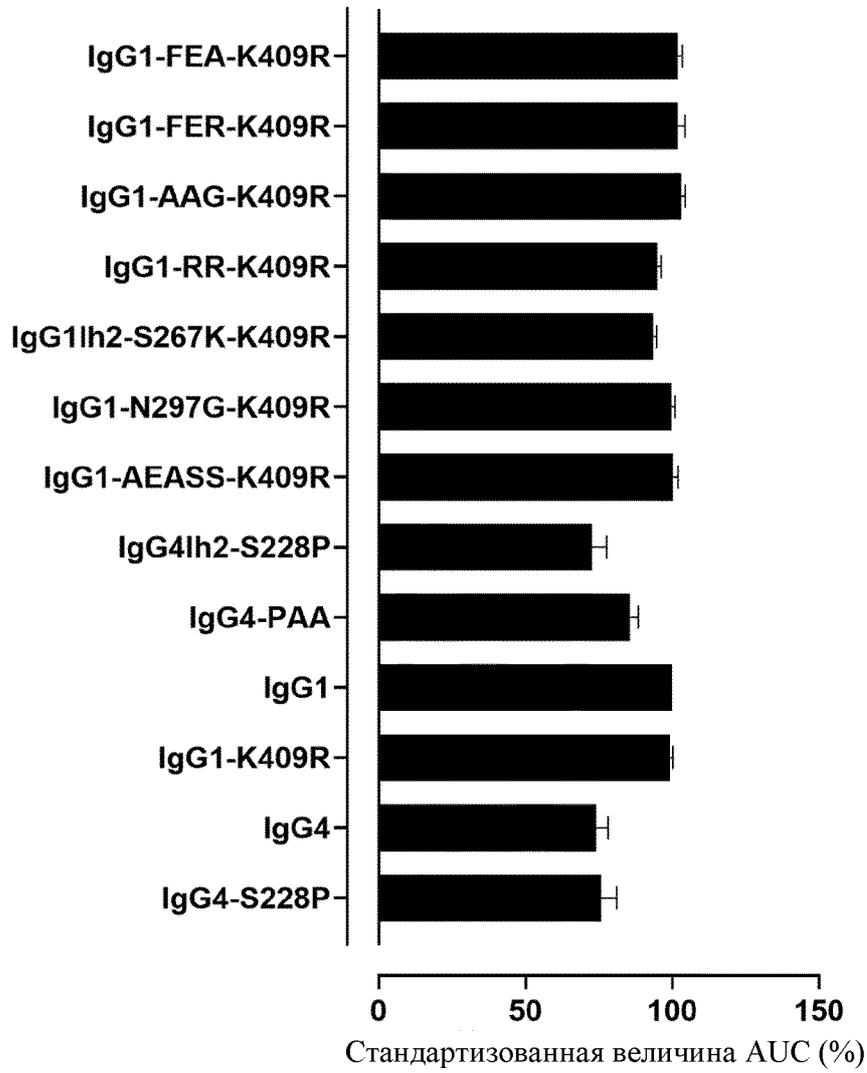


Фиг. 3



**Фиг. 4**

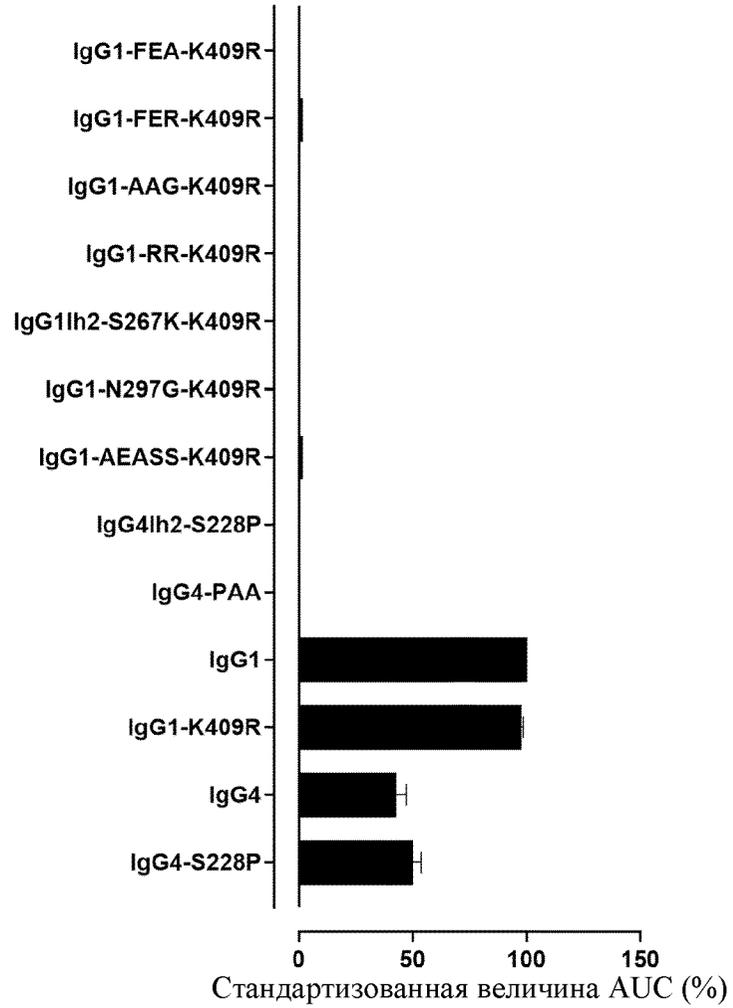
Проверка захвата на планшете для ELISA - анти-Fcγ-HRP



Фиг. 5

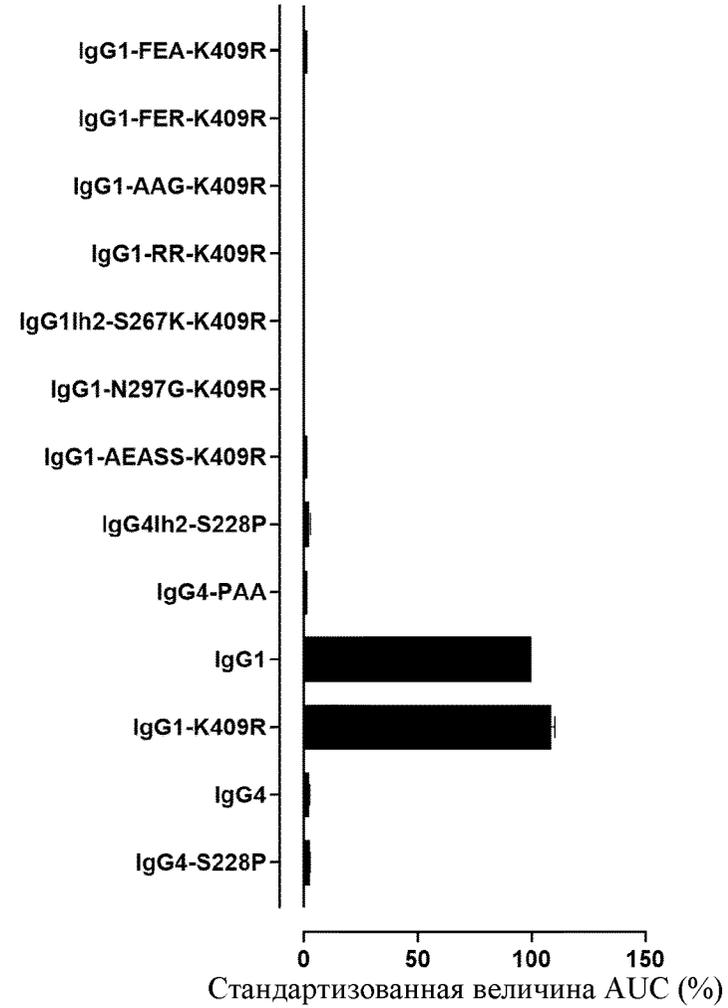
**A**

ELISA - FcγRIa



**Б**

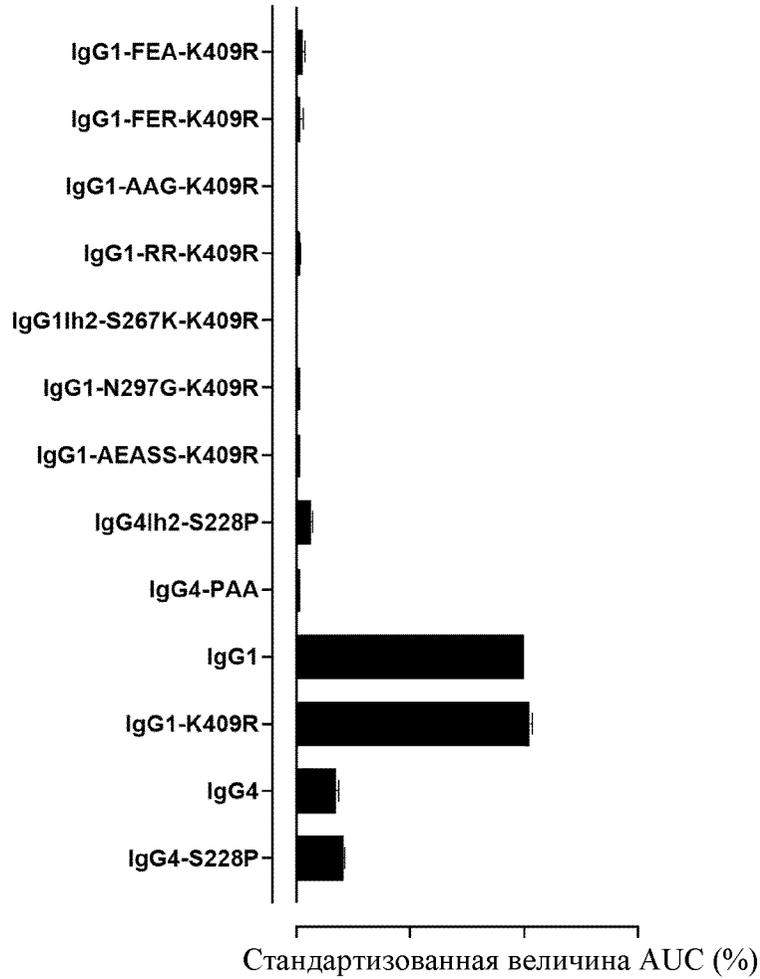
Elisa - FcγRIIa(H)



**Фиг. 6**

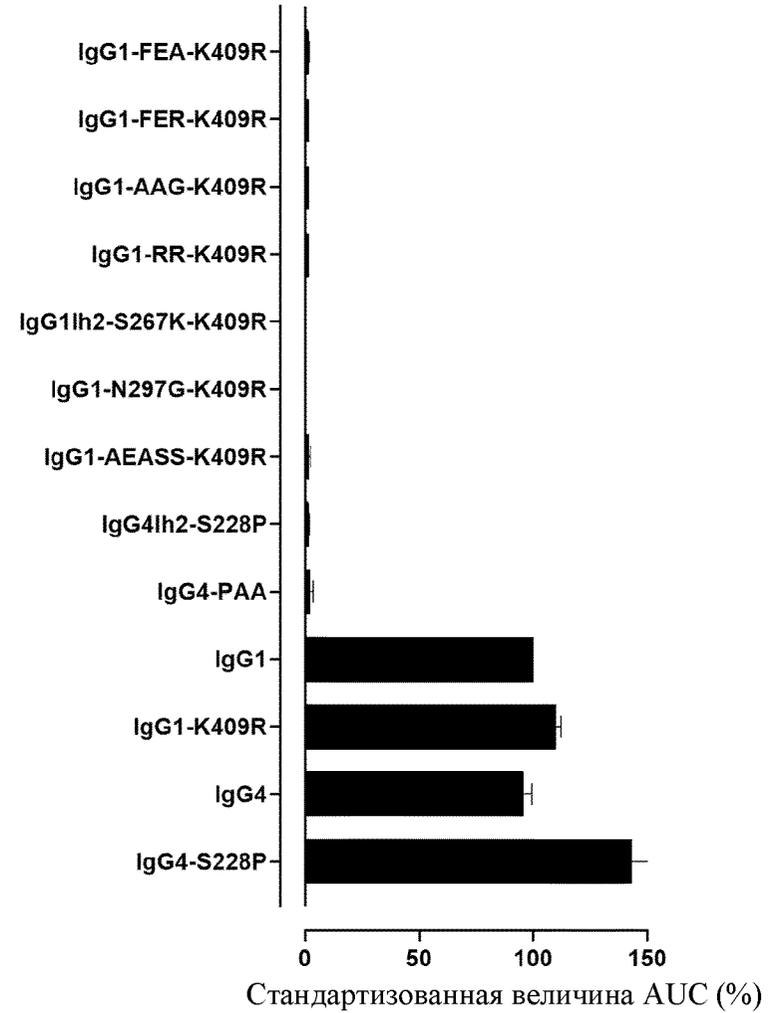
**B**

ELISA - FcγRIIa(R)



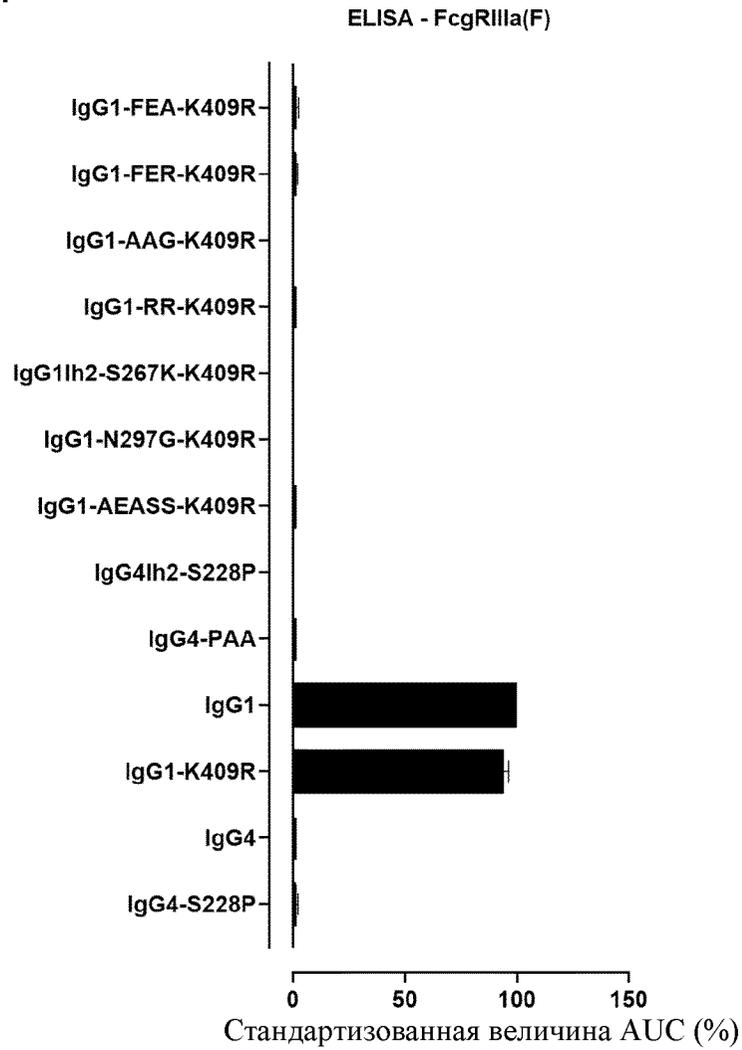
**Г**

ELISA - FcγRIIb

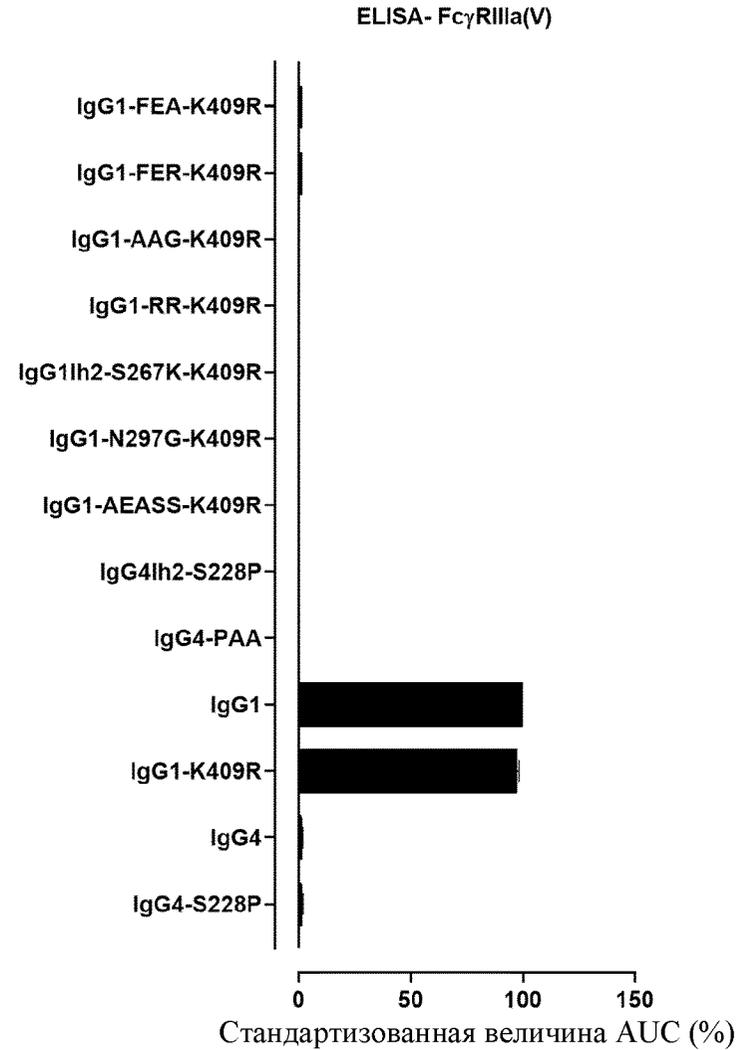


**Фиг. 6 продолжение**

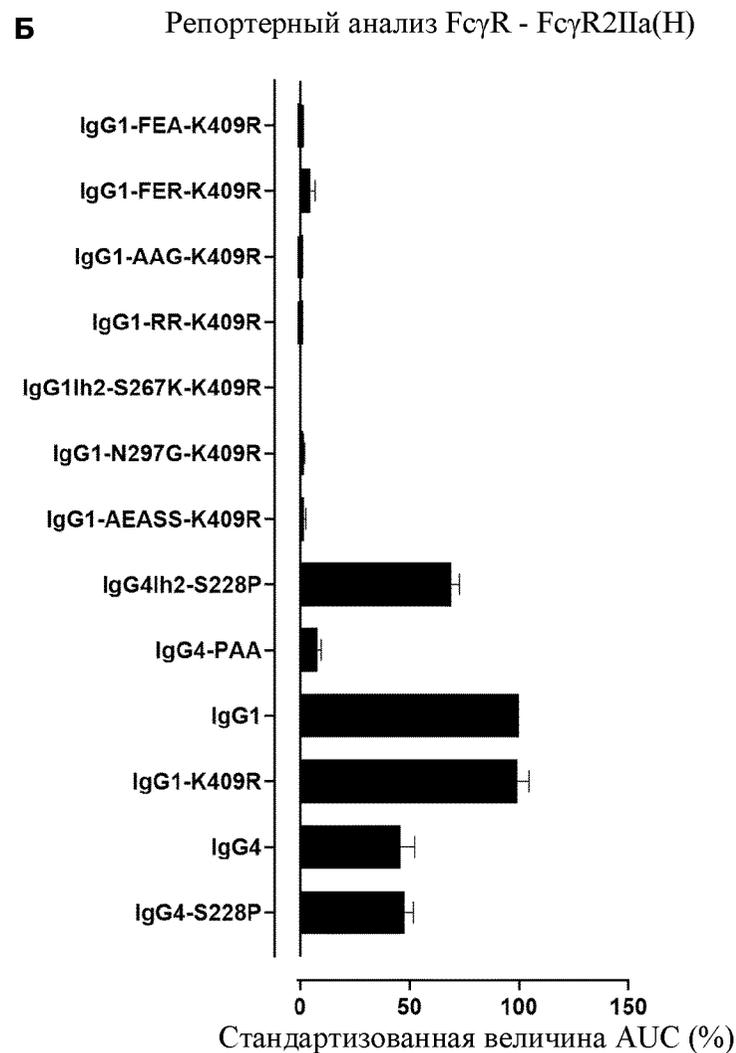
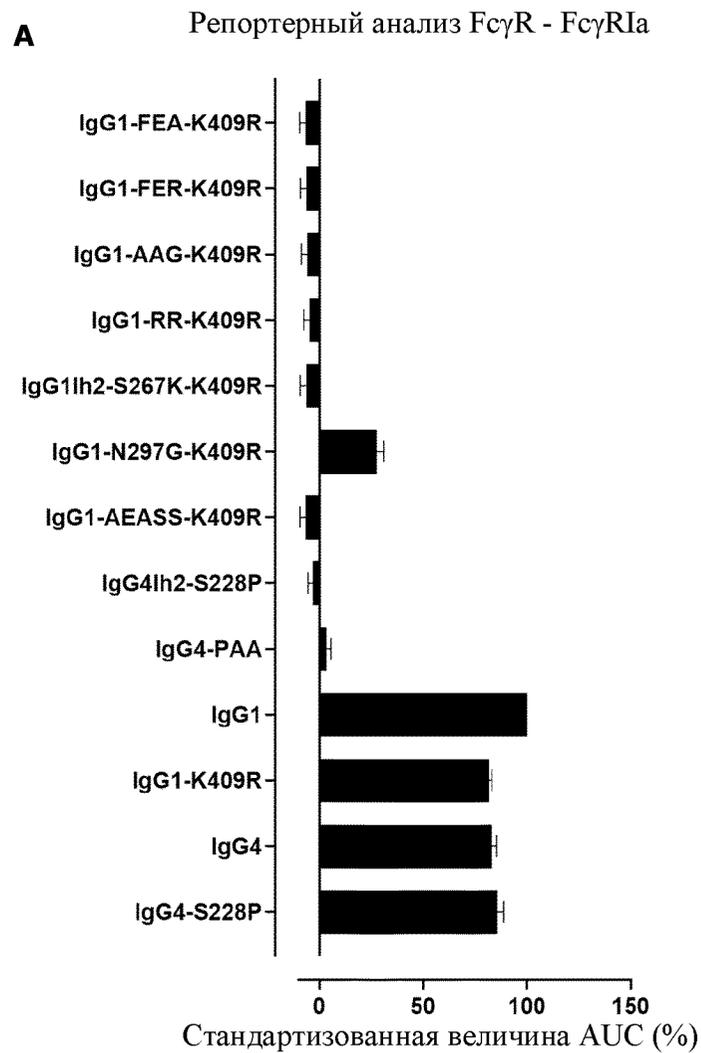
**Д**



**Е**

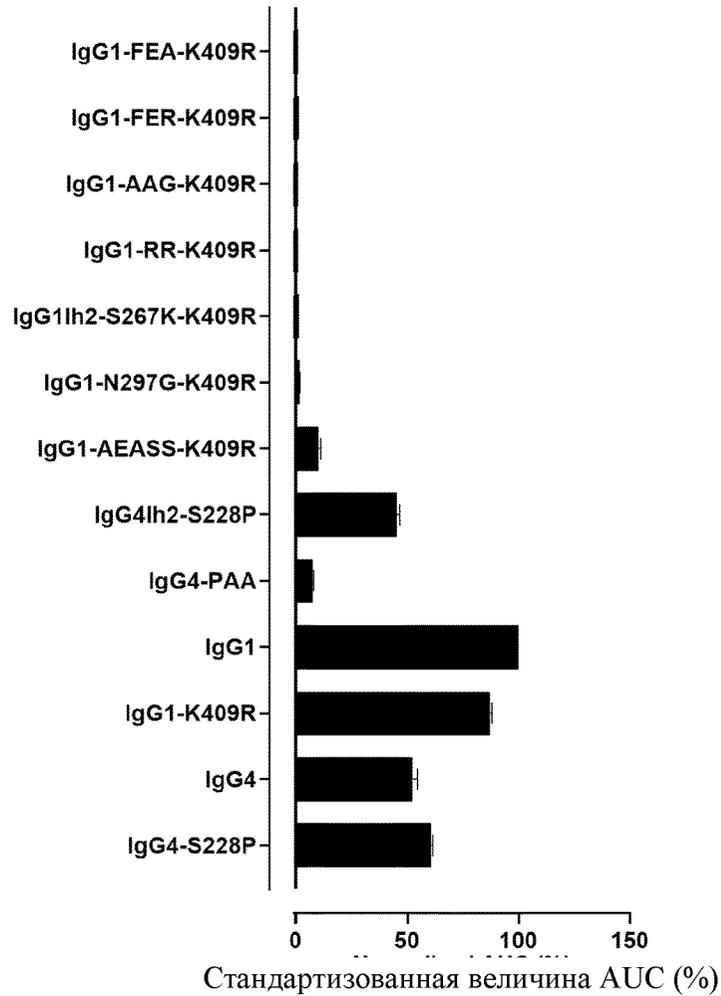


**Фиг. 6 продолжение**

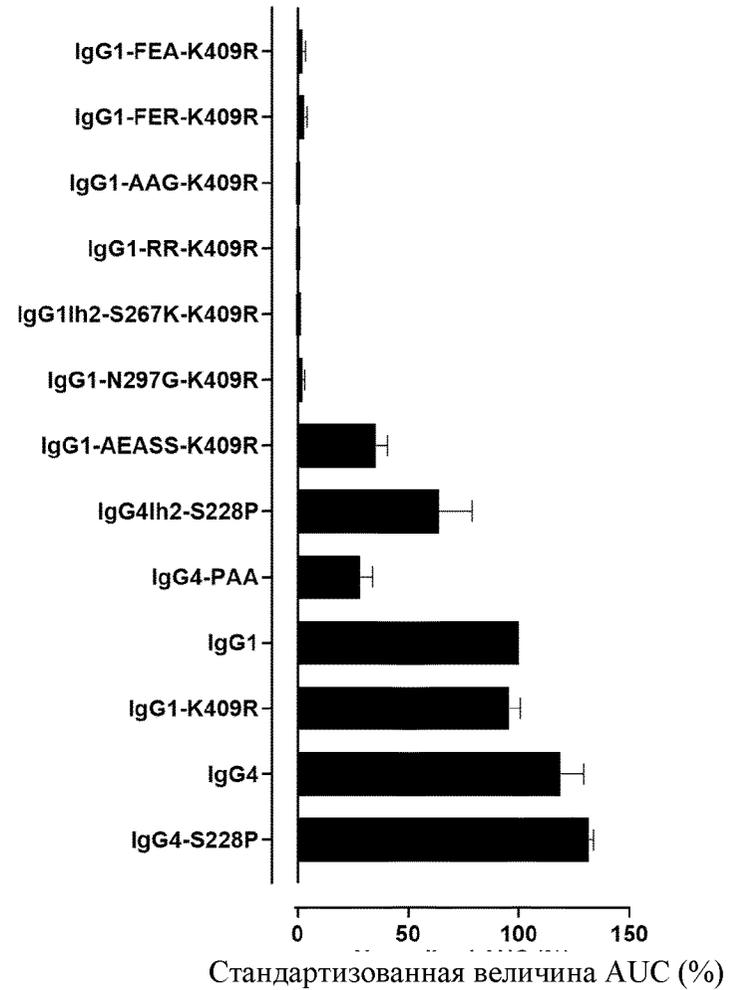


**Фиг. 7**

**В** Репортерный анализ FcγR - FcγR2IIa(R)



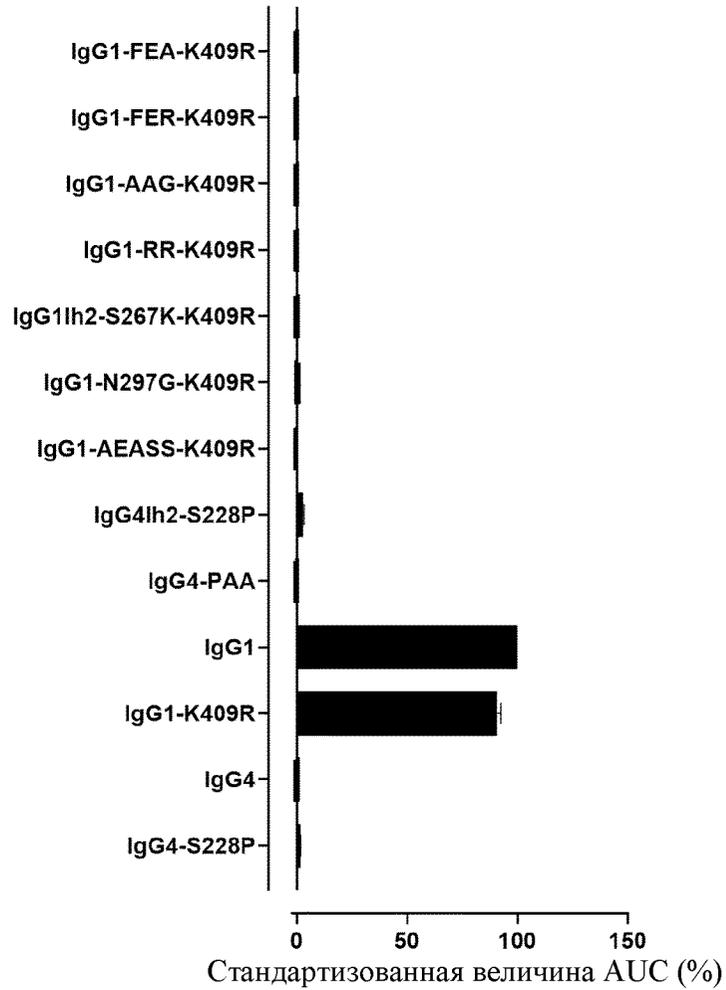
**Г** Репортерный анализ FcγR - FcγRIIb



**Фиг. 7 продолжение**

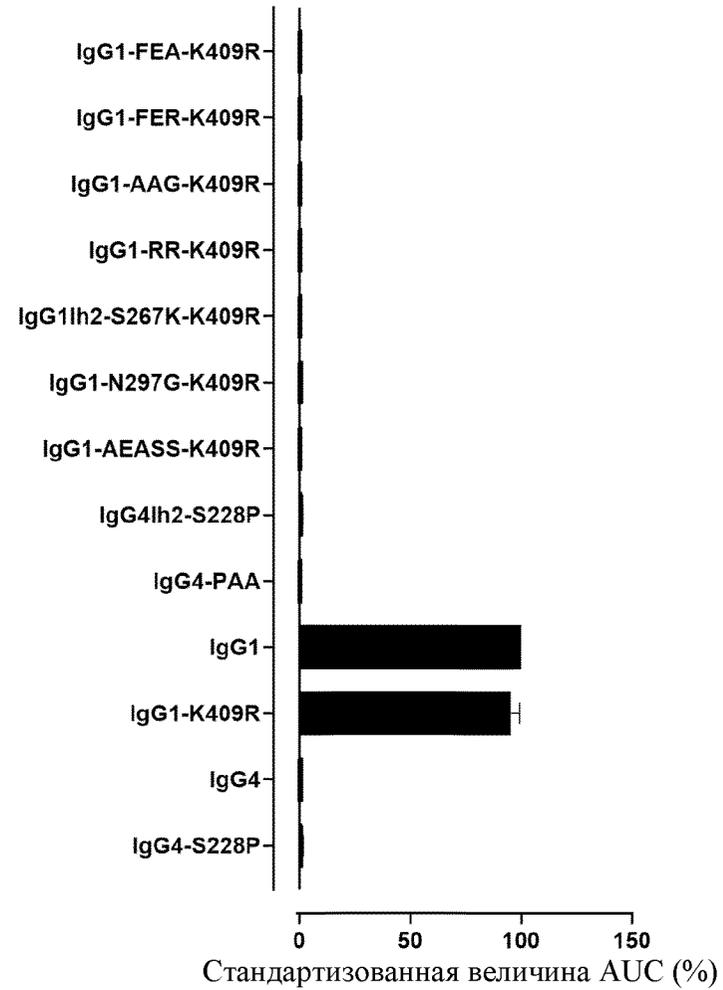
**Д**

Репортерный анализ FcγR - FcγRIIIa(F)



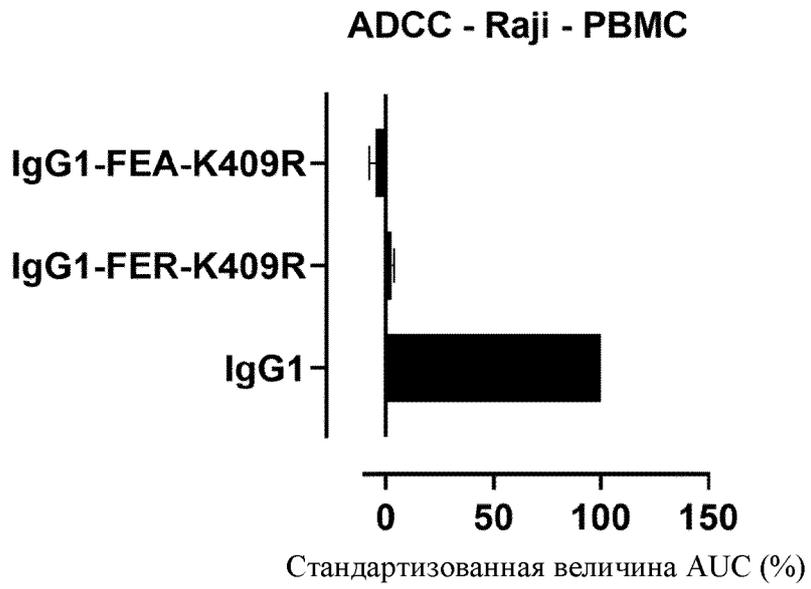
**Е**

Репортерный анализ FcγR - FcγRIIIa(V)



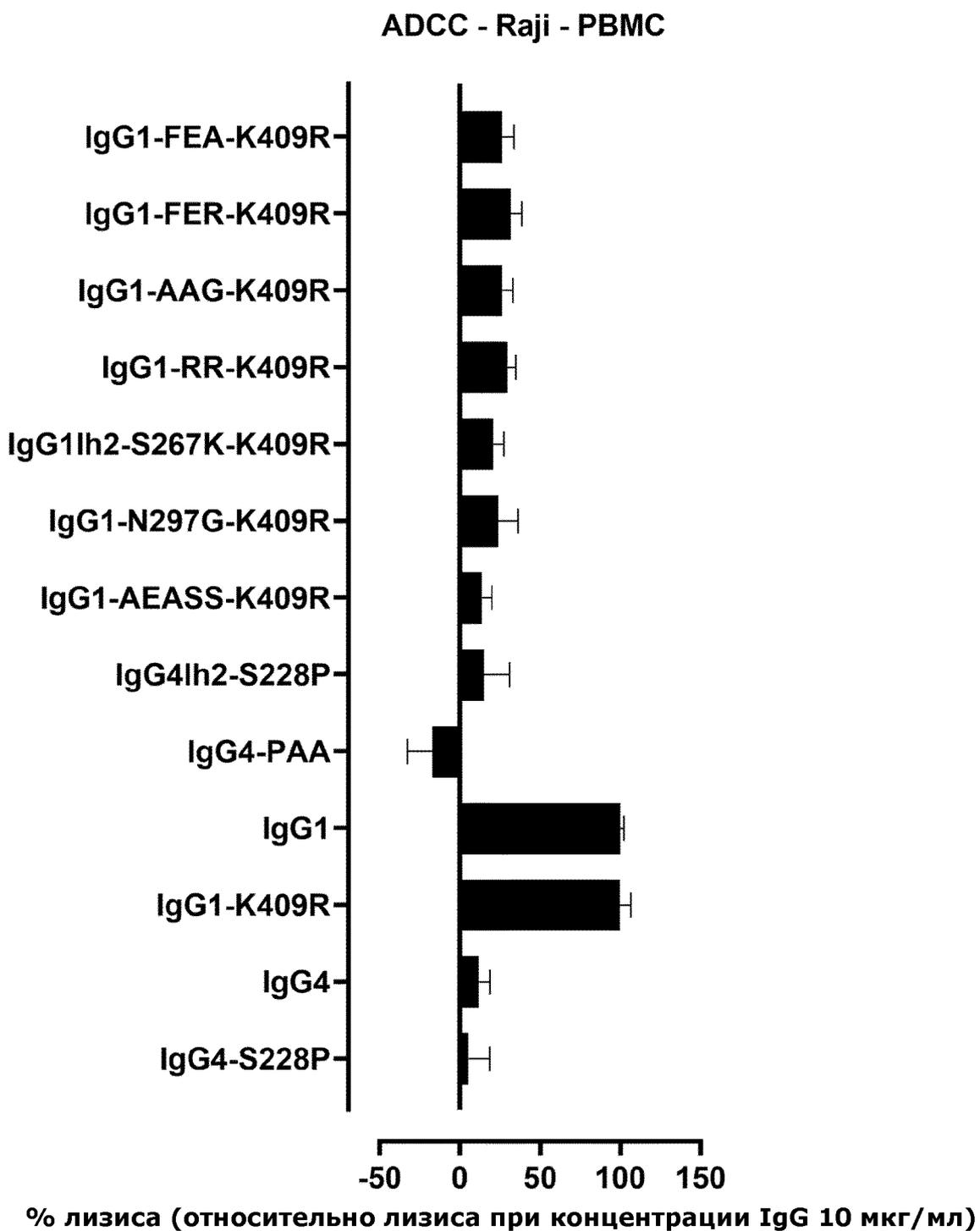
**Фиг. 7 продолжение**

**A**



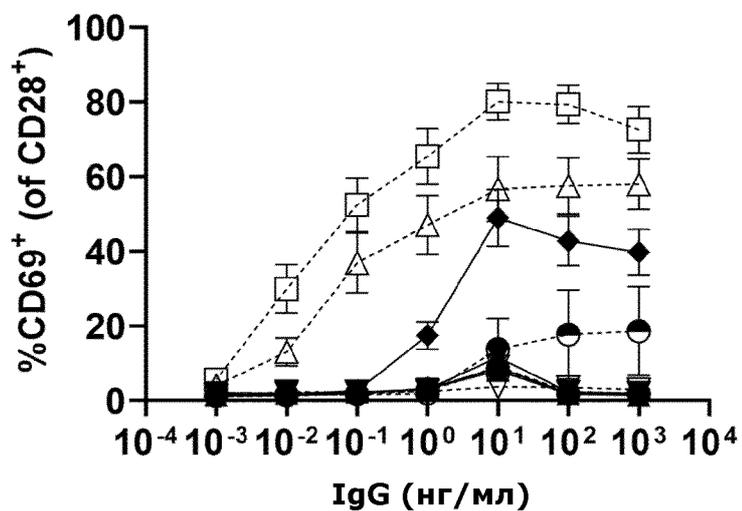
**Фиг. 8**

Б



Фиг. 8 продолжение

**A**      **Анализ активации Т-клеток (CD69<sup>+</sup>) - РВМС**

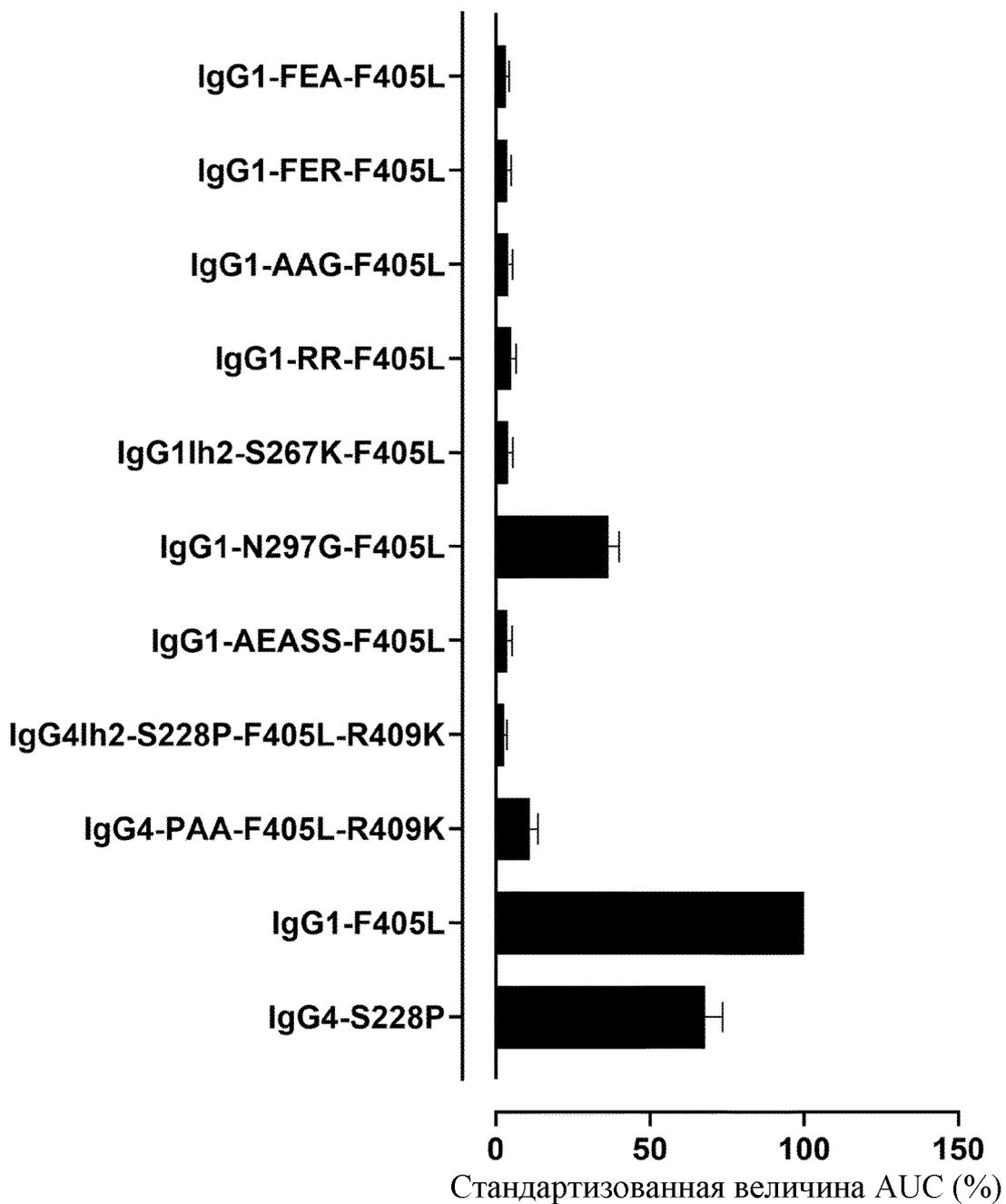


- ⊙ IgG1-FEA-F405L
- IgG1-FER-F405L
- ▽ IgG1-AAG-F405L
- ▼ IgG1-RR-F405L
- ◇ IgG1h2-S267K-F405L
- ◆ IgG1-N297G-F405L
- ▲ IgG1-AEASS-F405L
- ▽ IgG4h2-S228P-F405L-R409K
- IgG4-PAA-F405L-R409K
- IgG1-F405L
- △ IgG4-S228P

**Фиг. 9**

Б

Анализ активации Т-клеток (CD69<sup>+</sup>) - PBMC

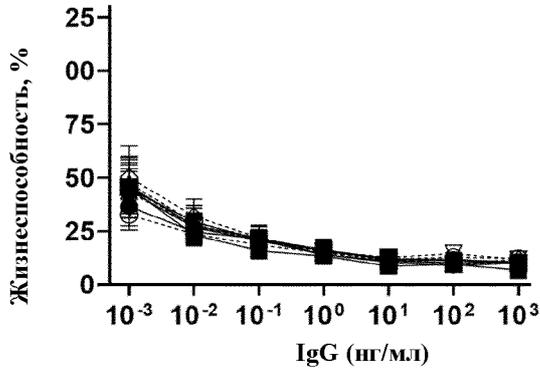


Фиг. 9 (продолжение)

**A**

Опосредуемая Т-клетками цитотоксичность - SKOV3

Варианты CD3 $\times$ HER2

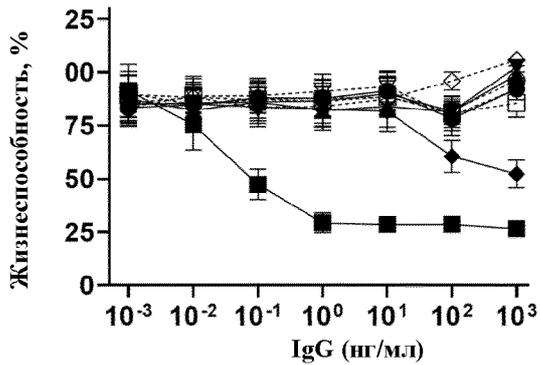


- BisG1 FEA-F405LxFEА-K409R
- BisG1 FER-F405LxFER-K409R
- ▽ BisG1 AAG-F405LxAAG-K409R
- ▼ BisG1 RR-F405LxRR-K409R
- ◇ BisG1lh2 S267K-F405LxS267K-K409R
- ◆ BisG1 N297G-F405LxN297G-K409R
- ▲ BisG1 AEASS-F405LxAEASS-K409R
- △ BisG4lh2 S228P-F405L-R409KxS228P
- BisG4 PAA-F405L-R409KxPAA
- BisG1 F405LxK409R

**Б**

Опосредуемая Т-клетками цитотоксичность - SKOV3

Варианты CD3 $\times$ b12

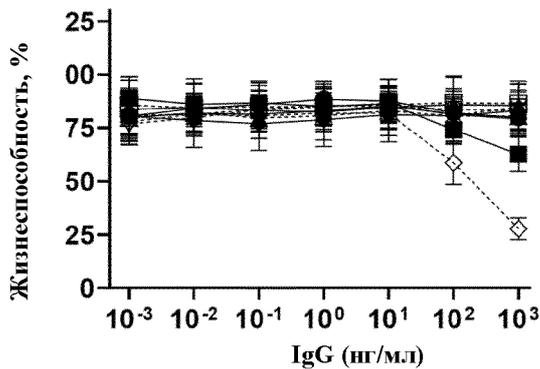


- BisG1 FEA-F405LxFEА-K409R
- BisG1 FER-F405LxFER-K409R
- ▽ BisG1 AAG-F405LxAAG-K409R
- ▼ BisG1 RR-F405LxRR-K409R
- ◇ BisG1lh2 S267K-F405LxS267K-K409R
- ◆ BisG1 N297G-F405LxN297G-K409R
- ▲ BisG1 AEASS-F405LxAEASS-K409R
- △ BisG4 PAA-F405L-R409KxPAA
- BisG1 F405LxK409R

**В**

Опосредуемая Т-клетками цитотоксичность - SKOV3

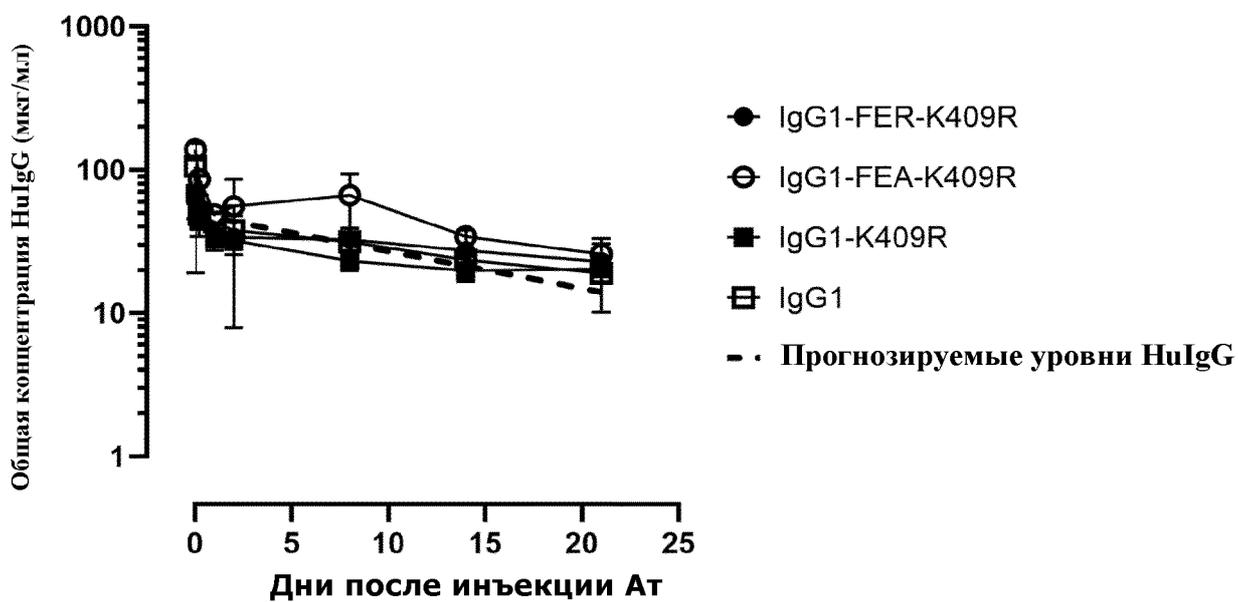
Варианты b12 $\times$ HER2



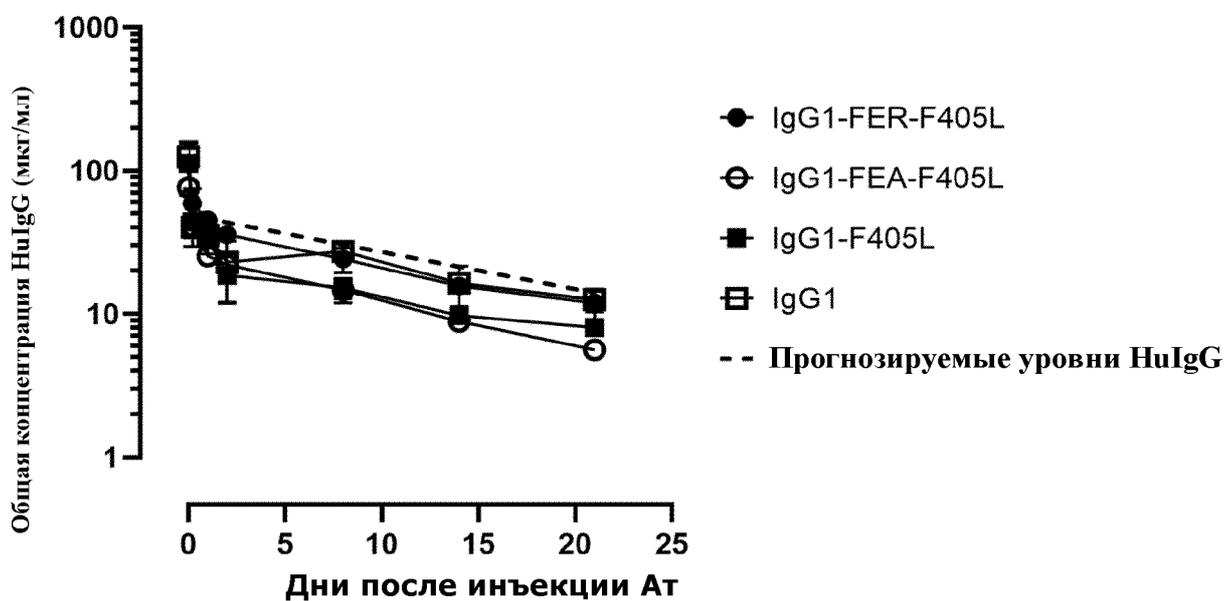
- BisG1 FEA-F405LxFEА-K409R
- BisG1 FER-F405LxFER-K409R
- ▽ BisG1 AAG-F405LxAAG-K409R
- ▼ BisG1 RR-F405LxRR-K409R
- ◇ BisG1lh2 S267K-F405LxS267K-K409R
- ◆ BisG1 N297G-F405LxN297G-K409R
- ▲ BisG1 AEASS-F405LxAEASS-K409R
- △ BisG4lh2 S228P-F405L-R409KxS228P
- BisG4 PAA-F405L-R409KxPAA
- BisG1 F405LxK409R

**Фиг. 10**

**А** Уровни HuIgG в сыворотке - варианты CD20

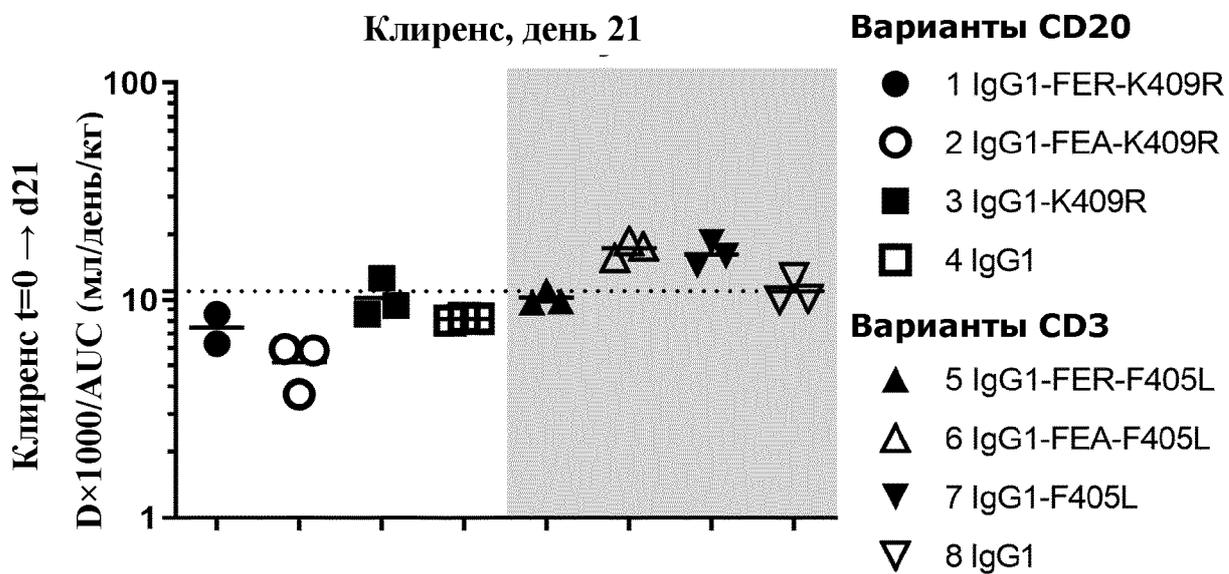


**Б** Уровни HuIgG в сыворотке - варианты CD3

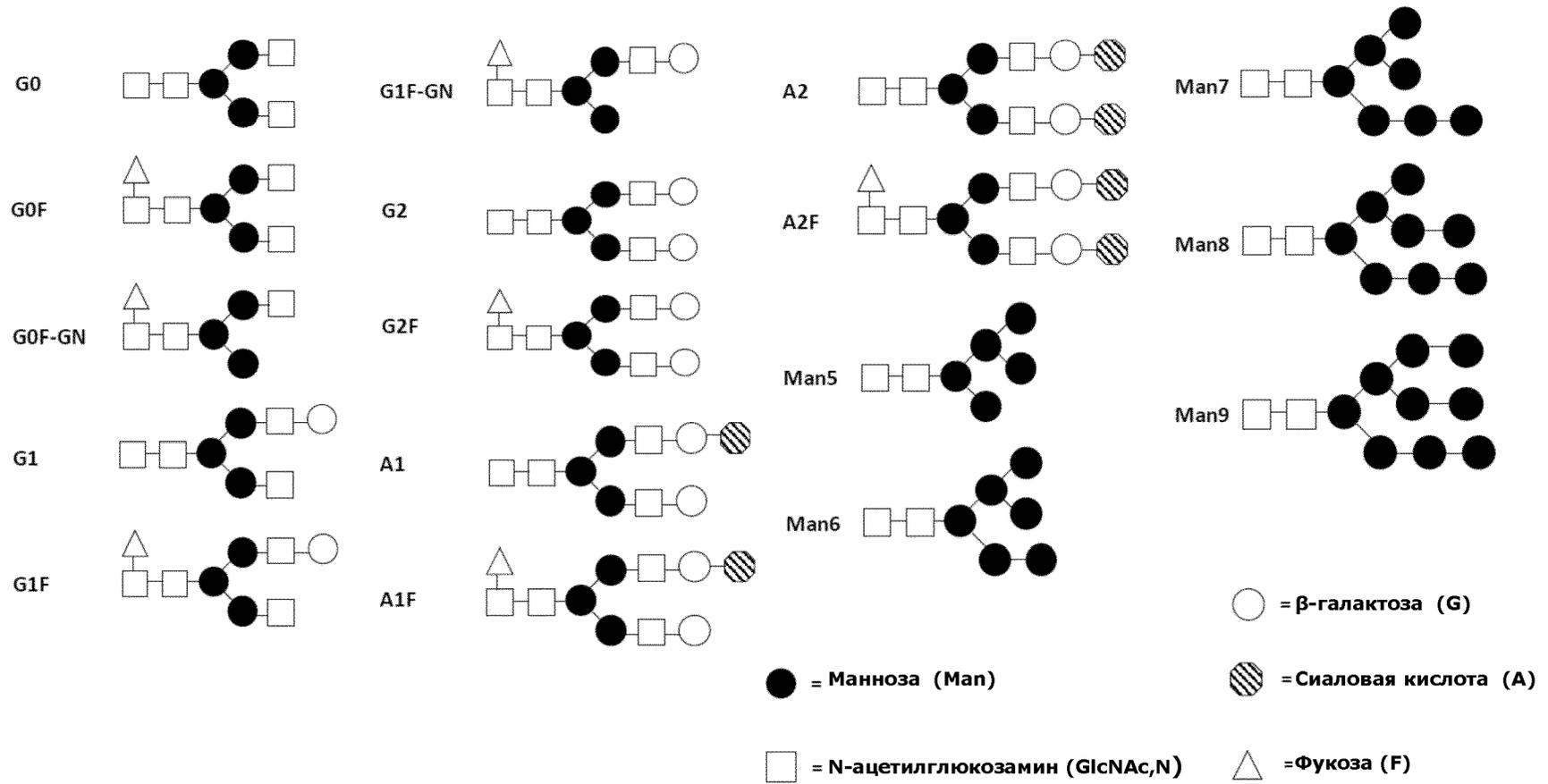


Фиг. 11

**В**

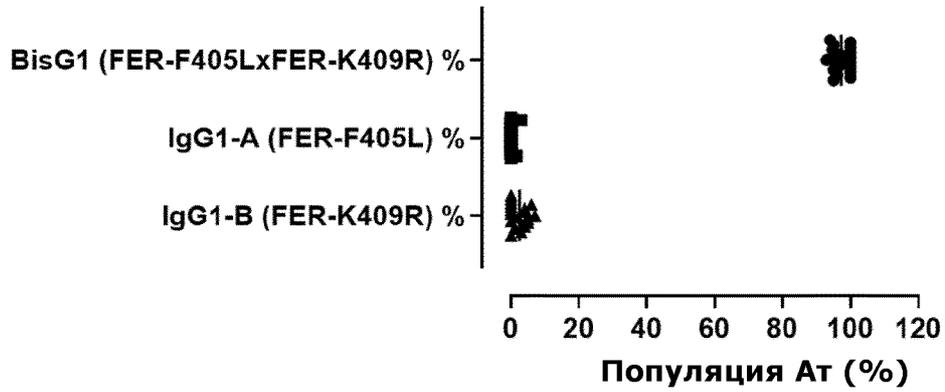


**Фиг. 11 продолжение**

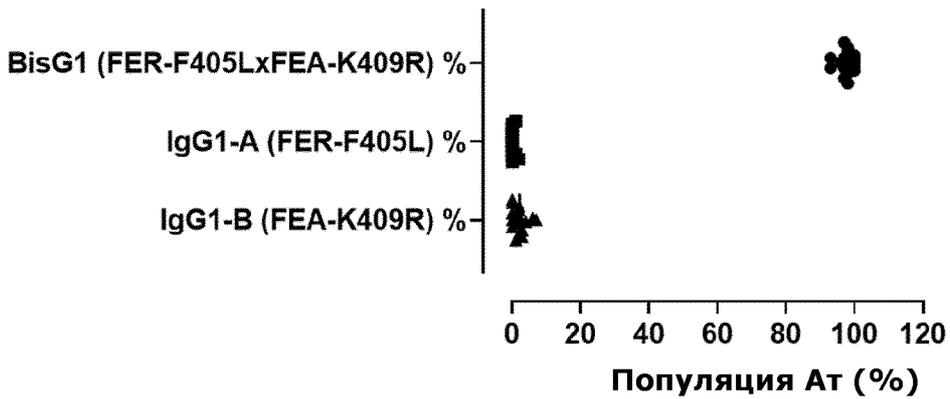


Фиг. 12

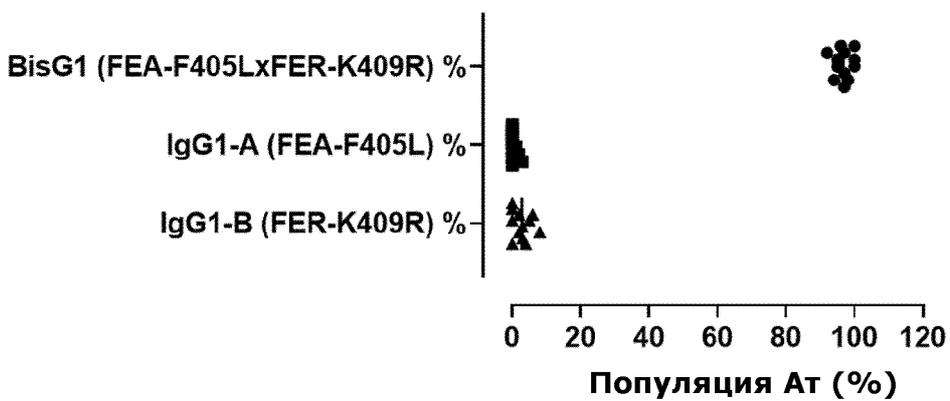
**А** Эффективность сFAE: FER-F405LxFER-K409R



**Б** Эффективность сFAE: FER-F405LxFEA-K409R

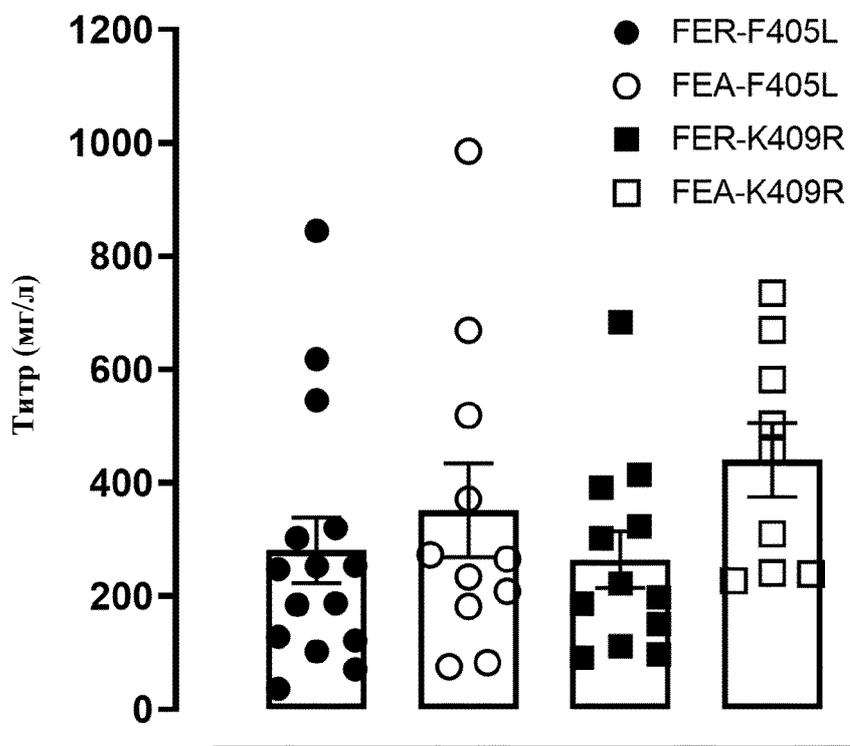


**В** Эффективность сFAE: FEA-F405LxFER-K409R

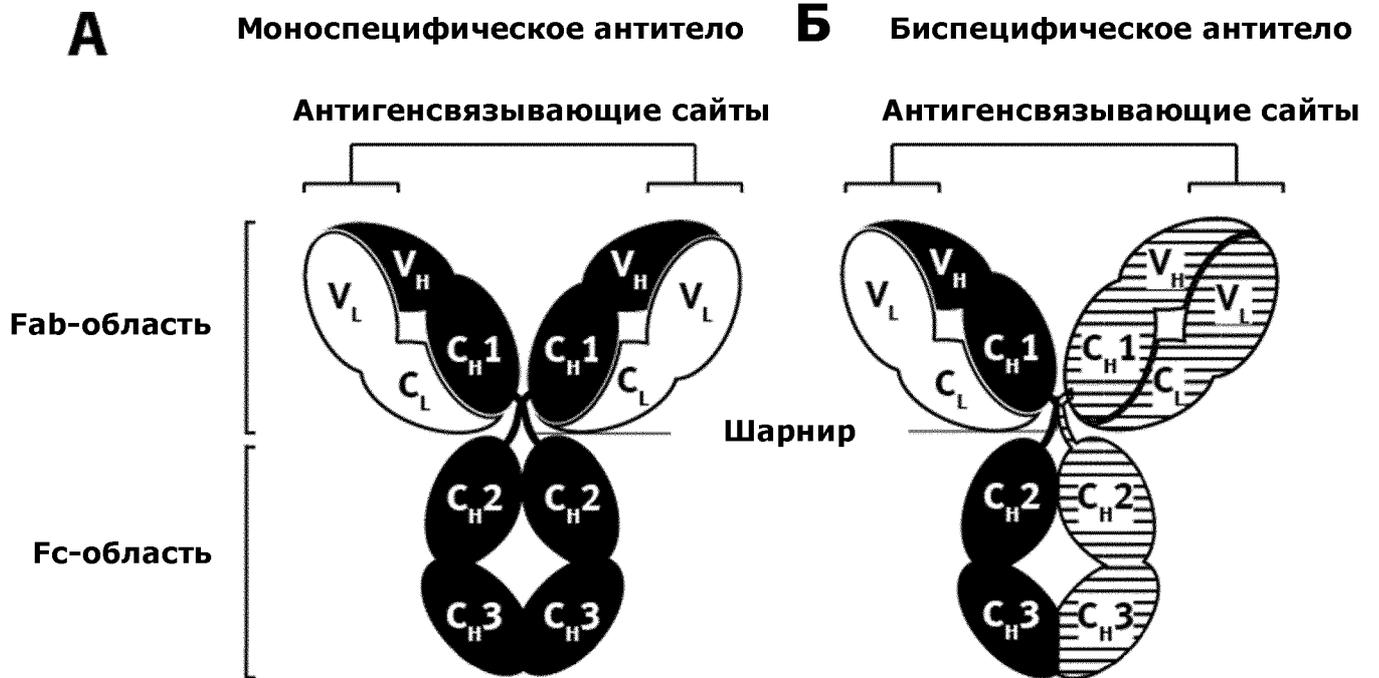


Фиг. 13

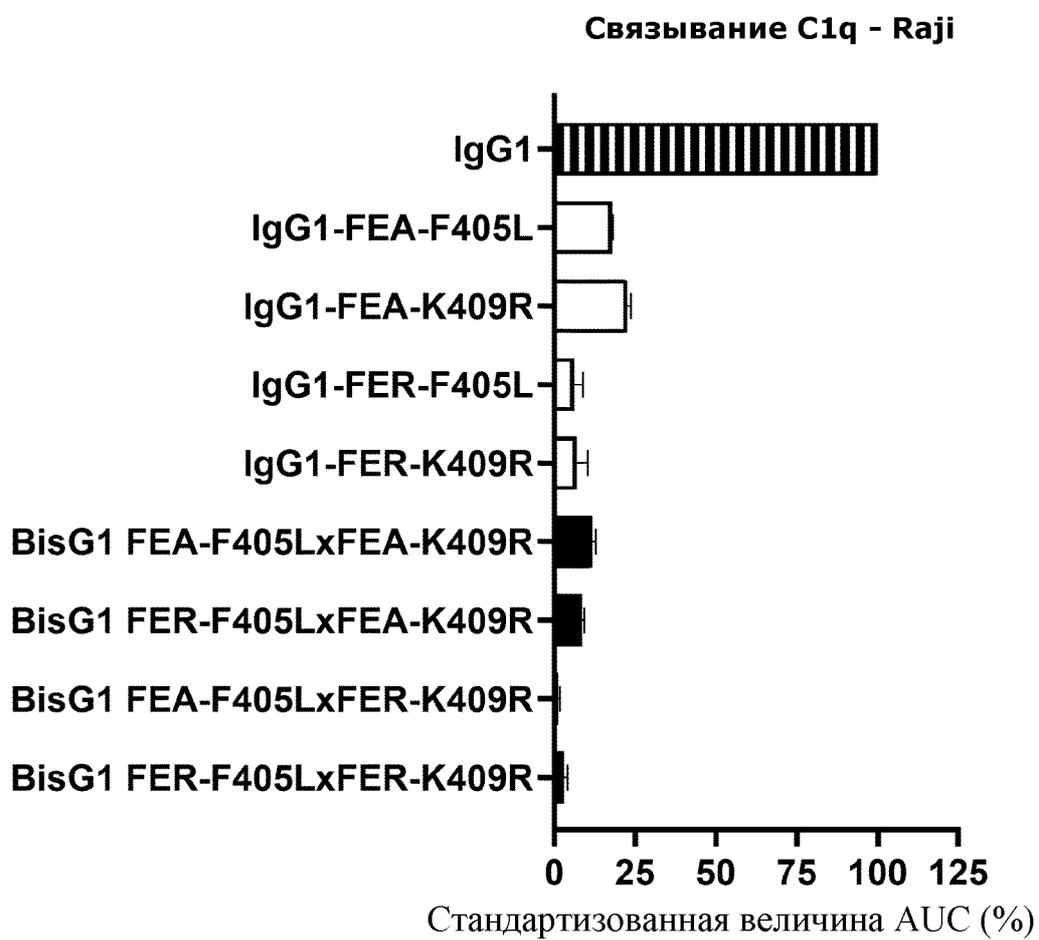
**Титр продуцированных антител в Exp1293F (мг/л)**



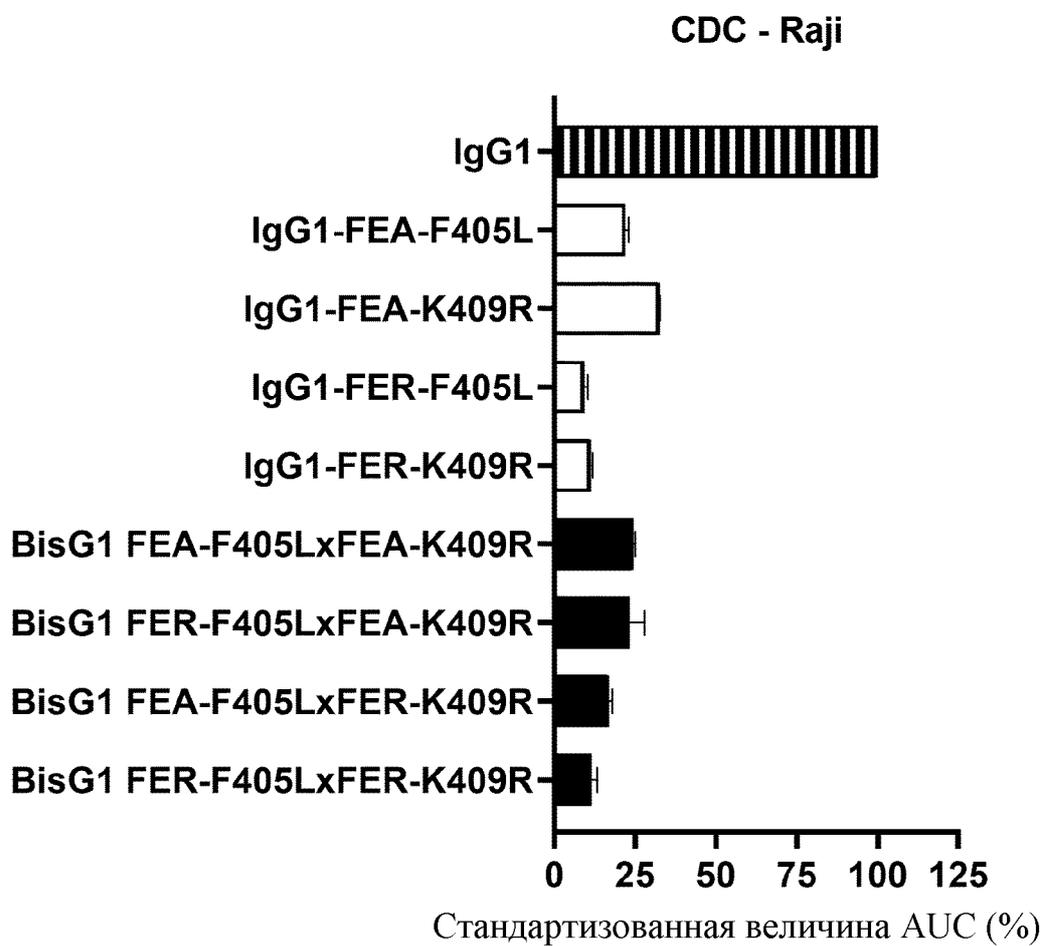
**Фиг. 14**



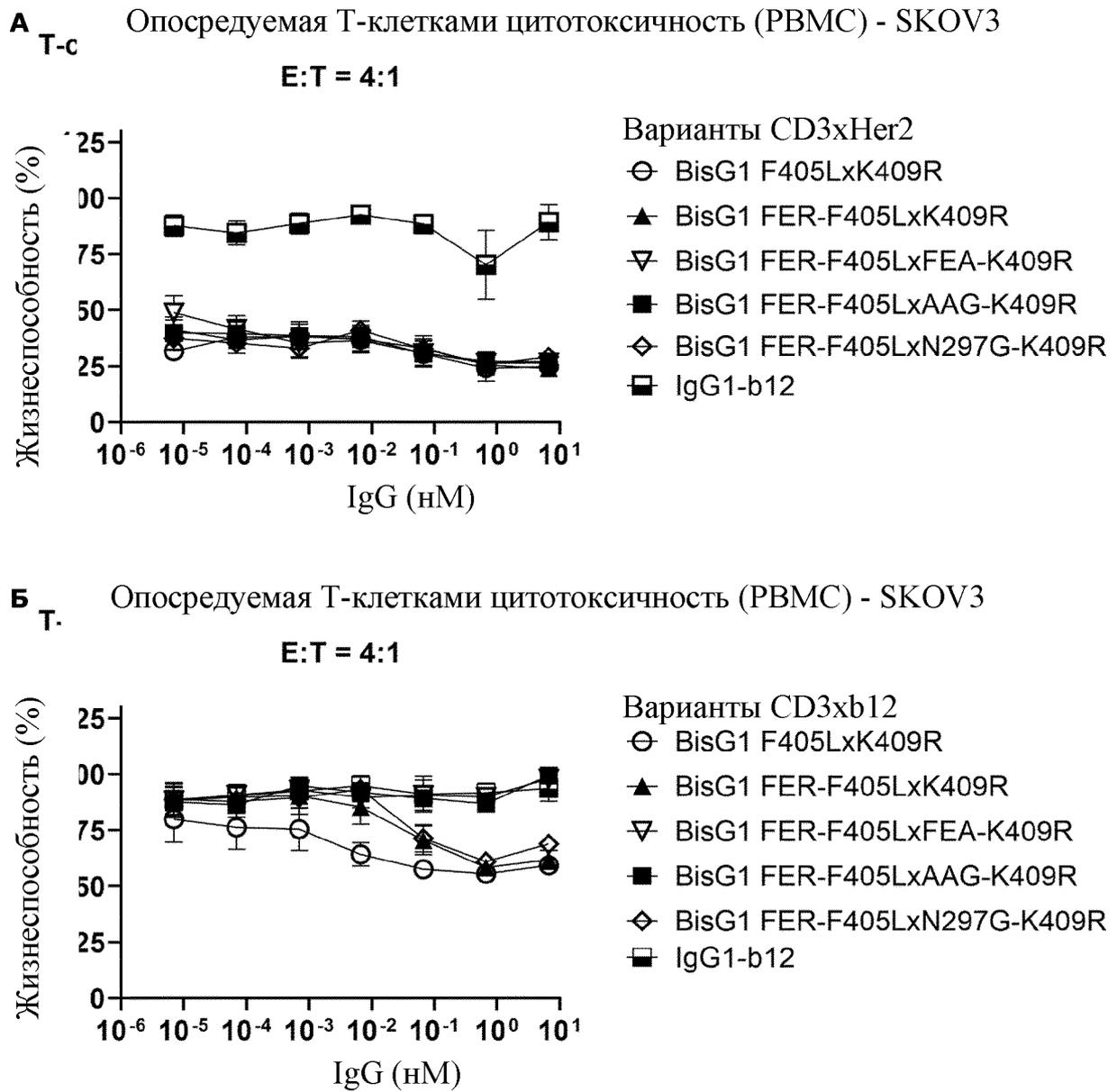
Фиг. 15



**Фиг. 16**

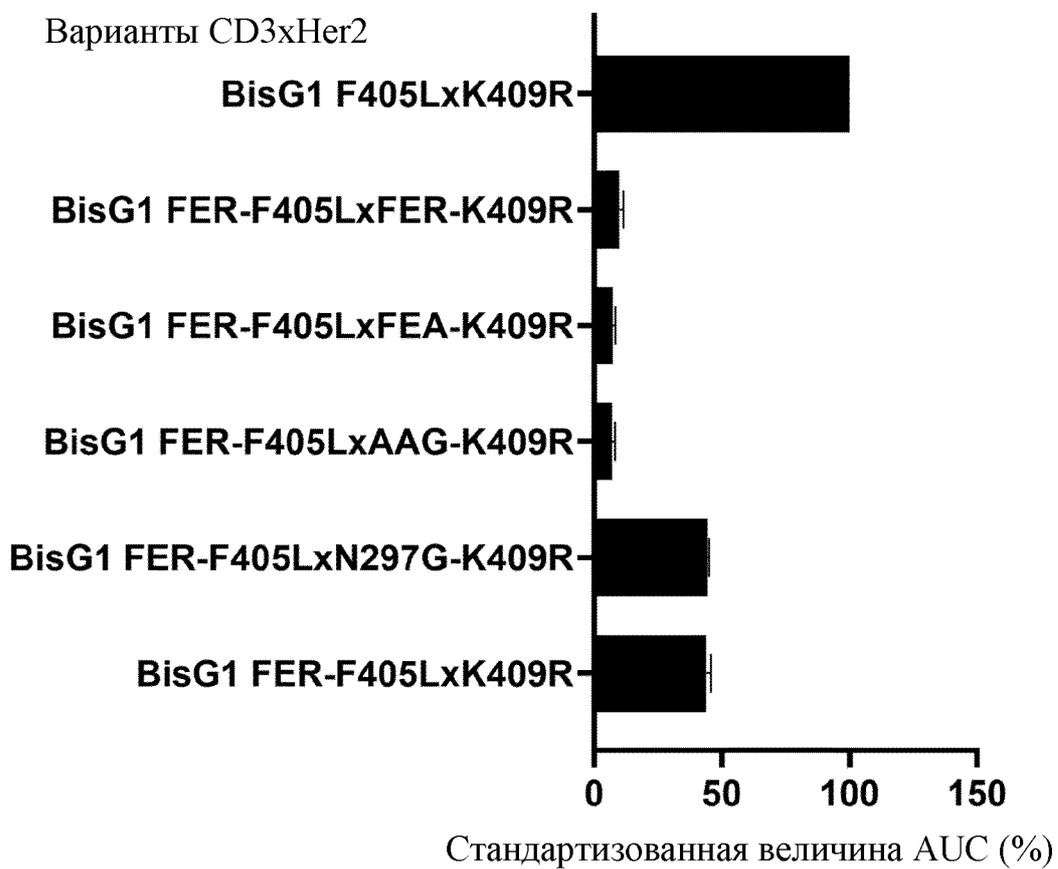


**Фиг. 17**



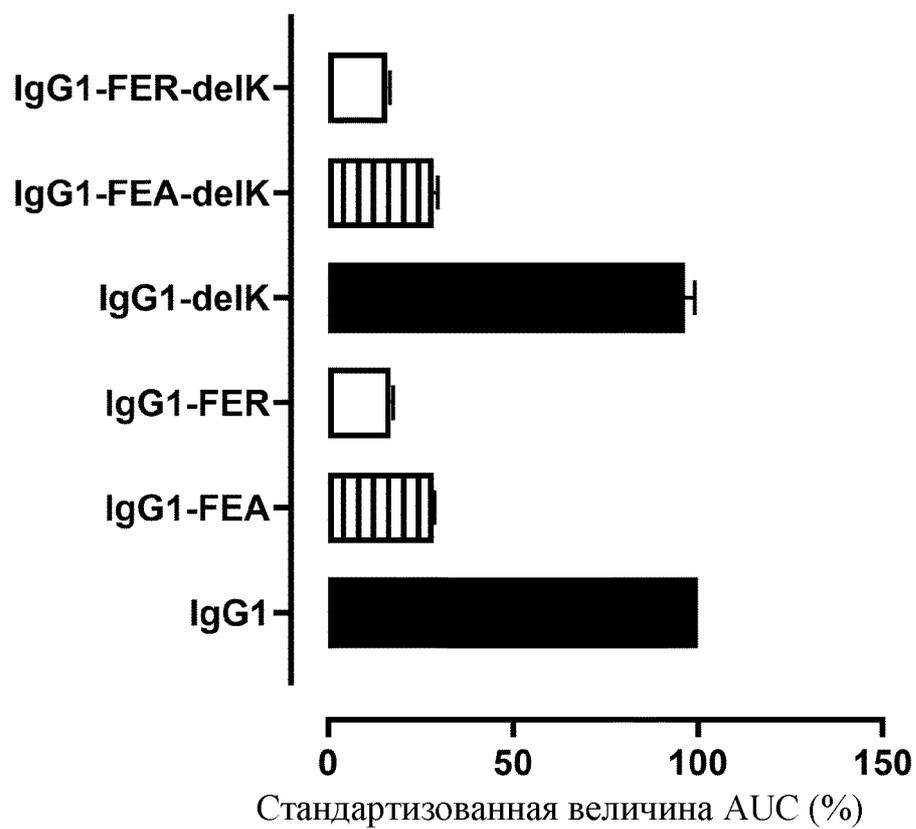
Фиг. 18

Анализ Т-клеточной активации (CD69<sup>+</sup>) -PBMC



Фиг. 19

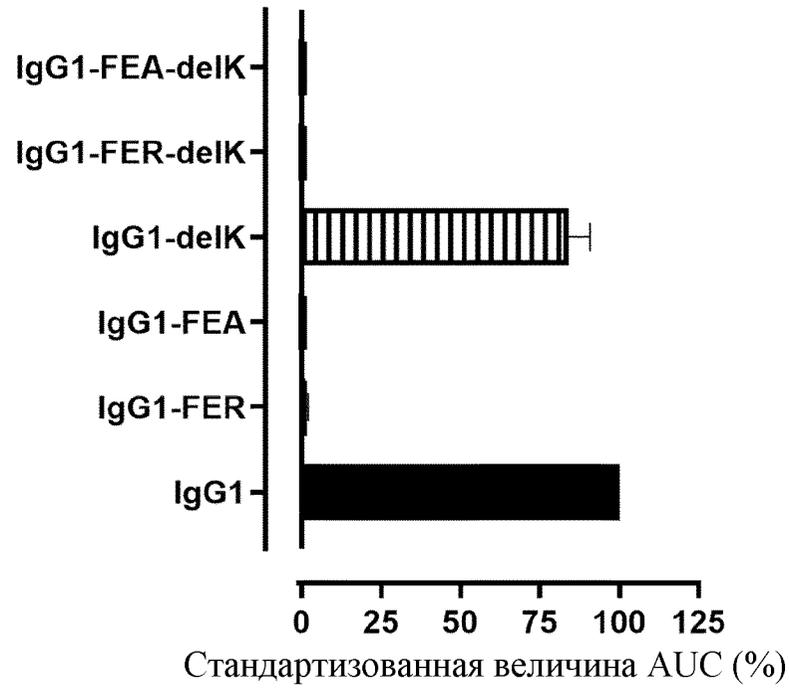
CDC - Raji



Фиг. 20

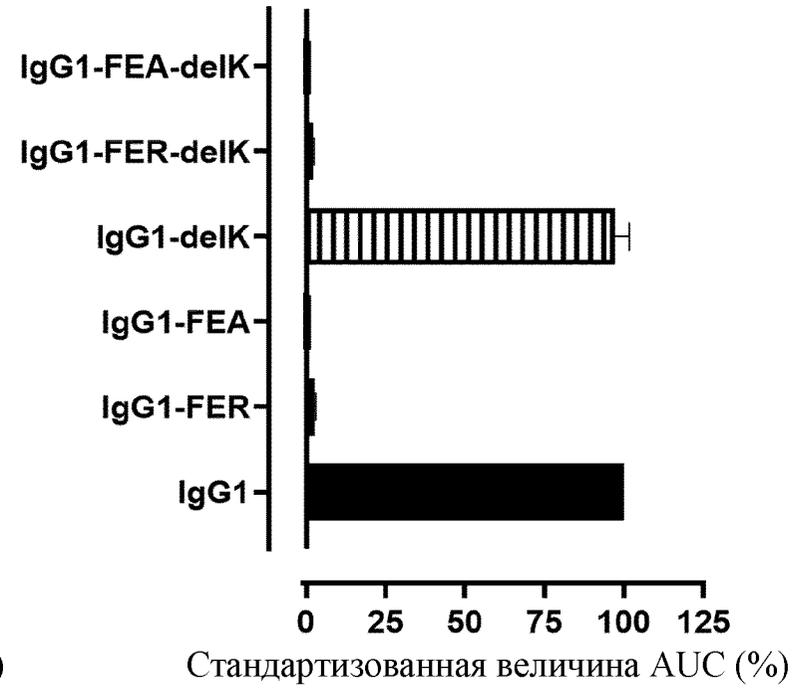
**А**

Репортерный анализ FcγR - FcγRIa



**Б**

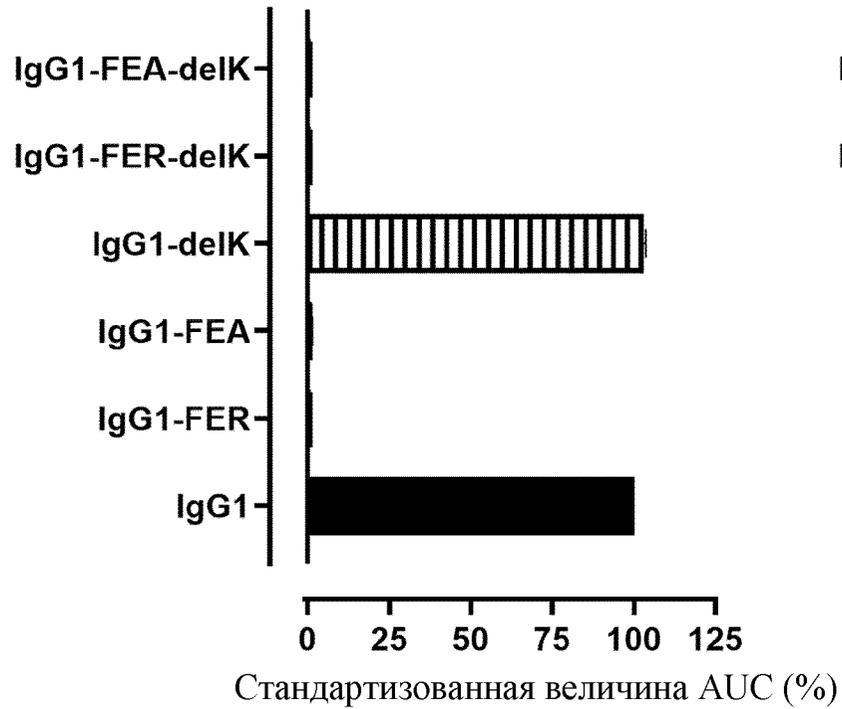
Репортерный анализ FcγR - FcγRIIa(H)



**Фиг. 21**

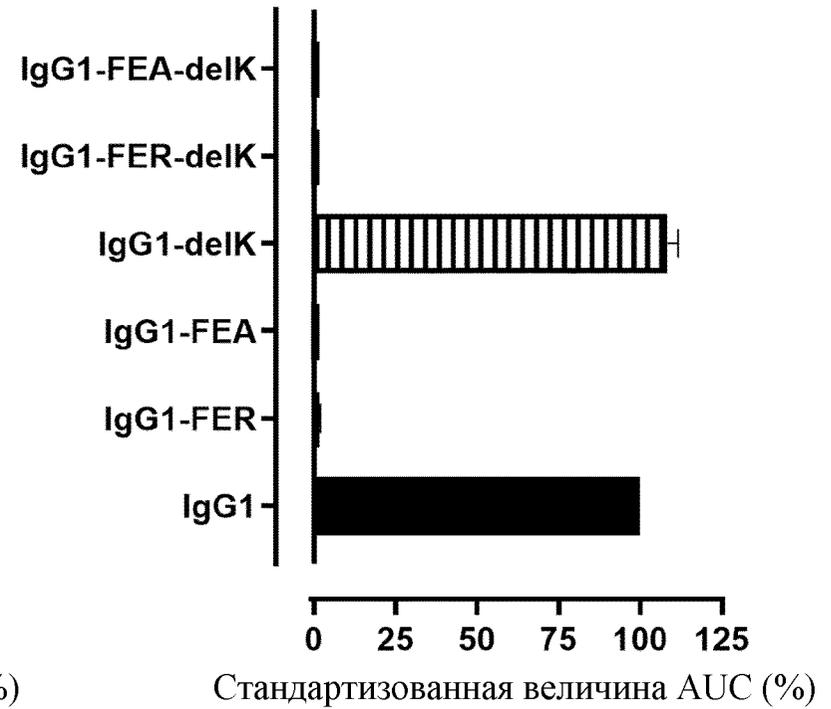
**В**

Репортерный анализ FcγR - FcγRIIb



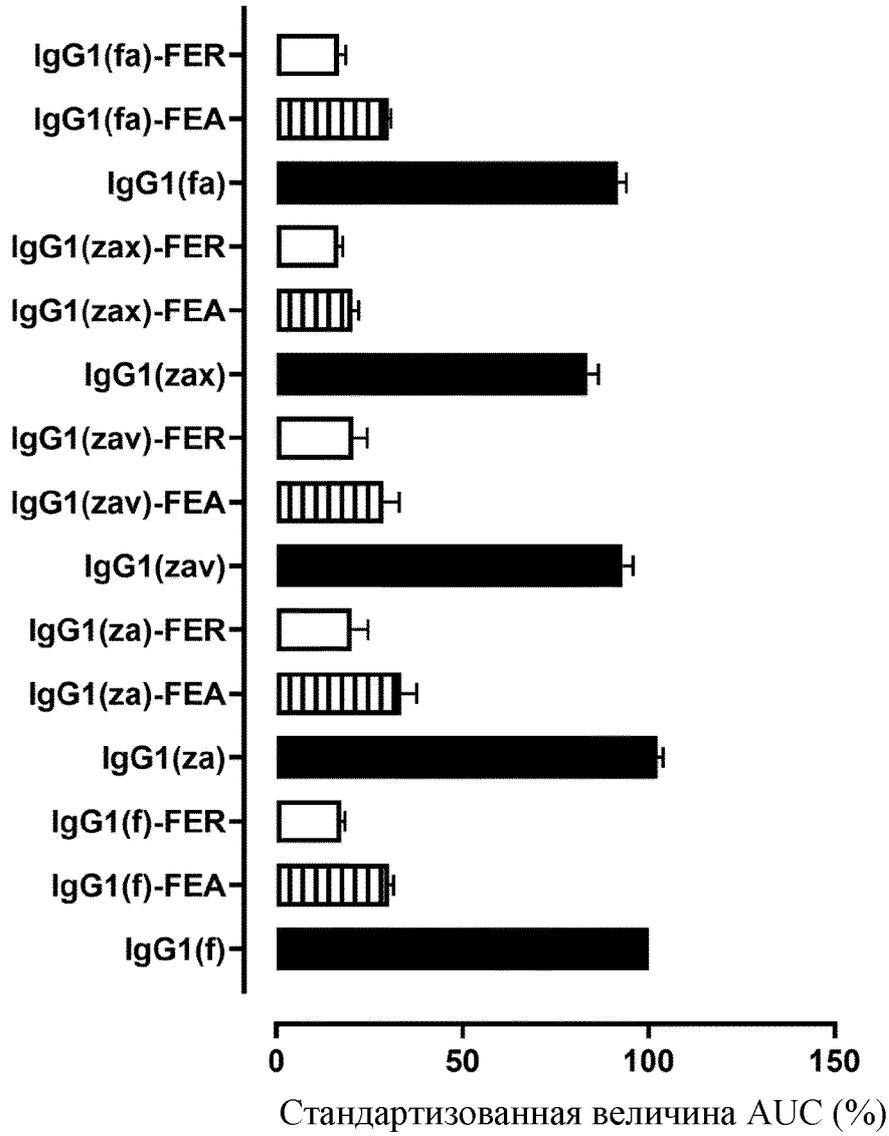
**Г**

Репортерный анализ FcγR - FcγRIIIa(V)



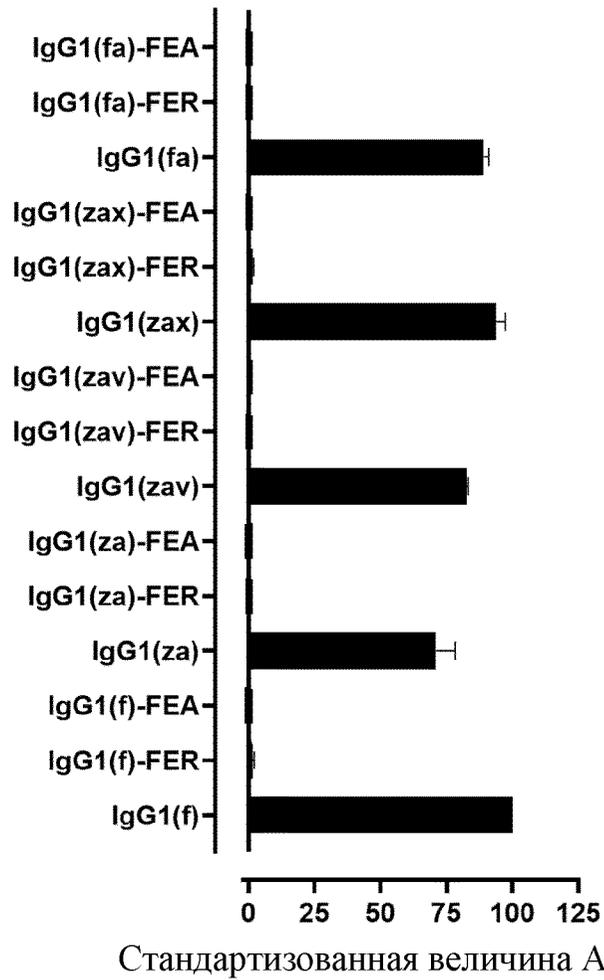
**Фиг. 21** продолжение

CDC - Raji

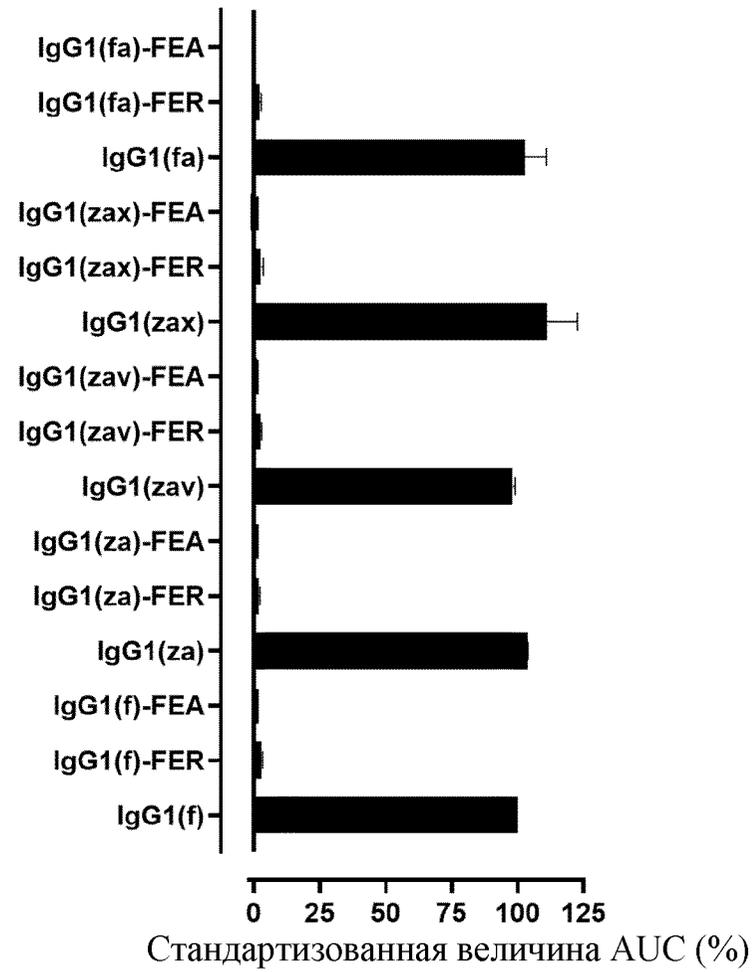


Фиг. 22

**А** Репортерный анализ FcγR - FcγRIa(H)

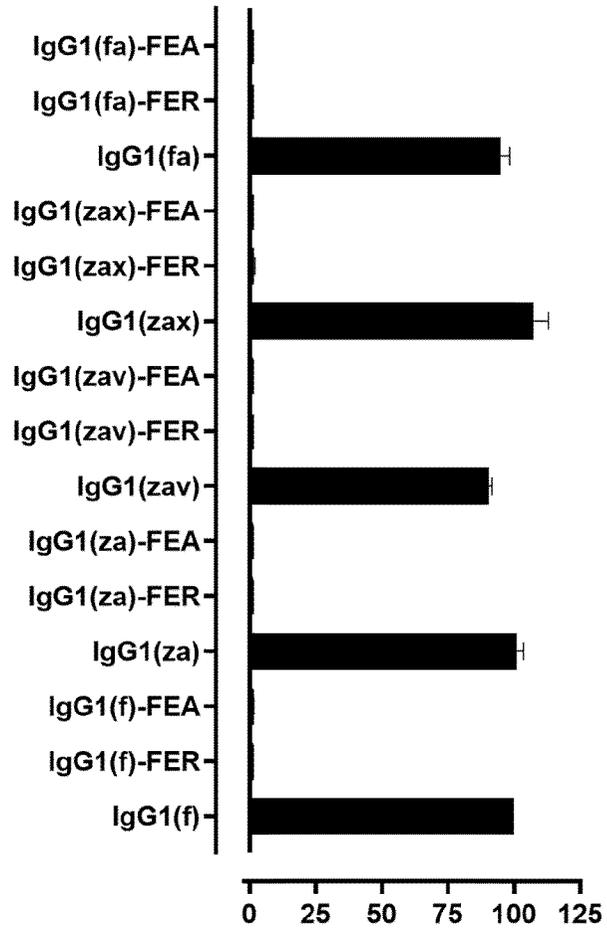


**Б** Репортерный анализ FcγR - FcγRIIa(H)



**Фиг. 23**

**В** Репортерный анализ FcγR - FcγRIIb



Стандартизованная величина AUC (%)

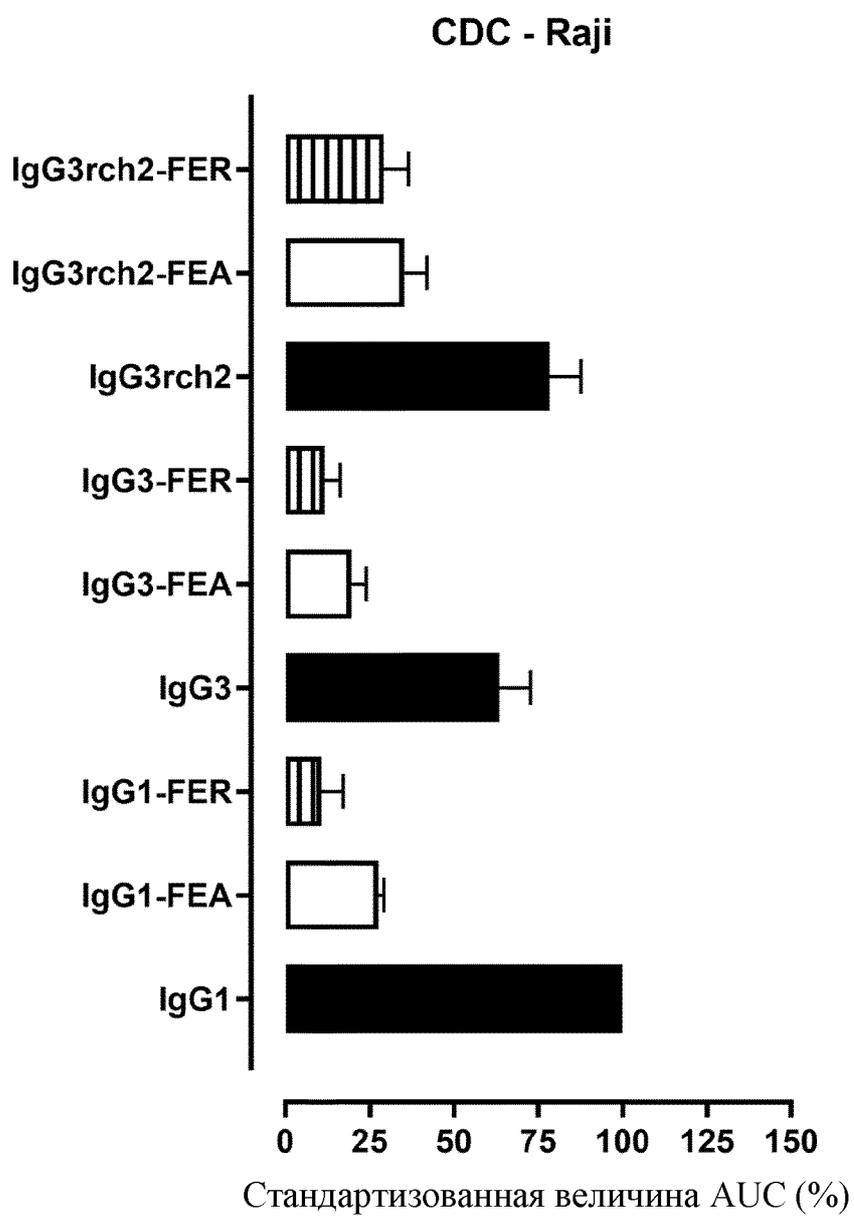
**Г** Репортерный анализ FcγR - FcγRIIIa(V)



Стандартизованная величина AUC (%)

**Фиг. 23 продолжение**

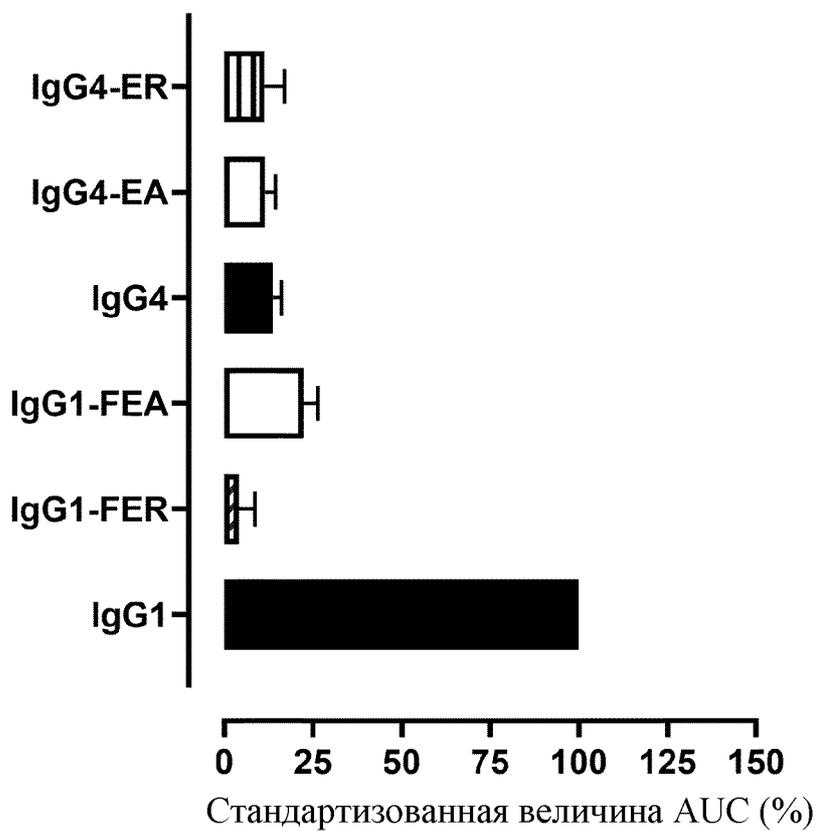
A



**Фиг. 24**

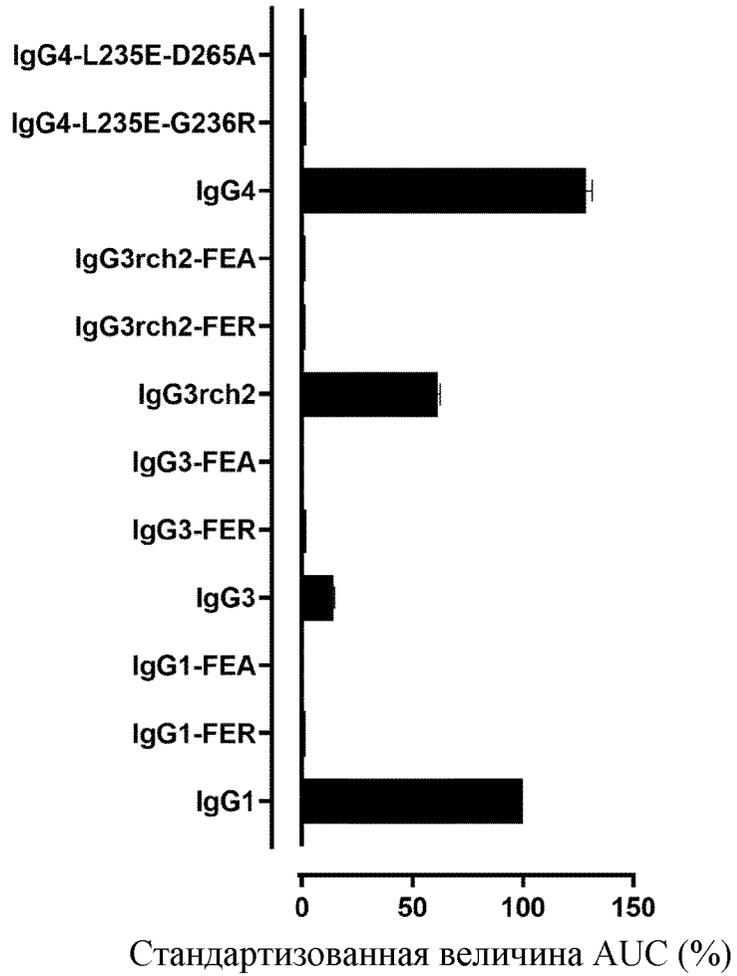
Б

CDC - Raji

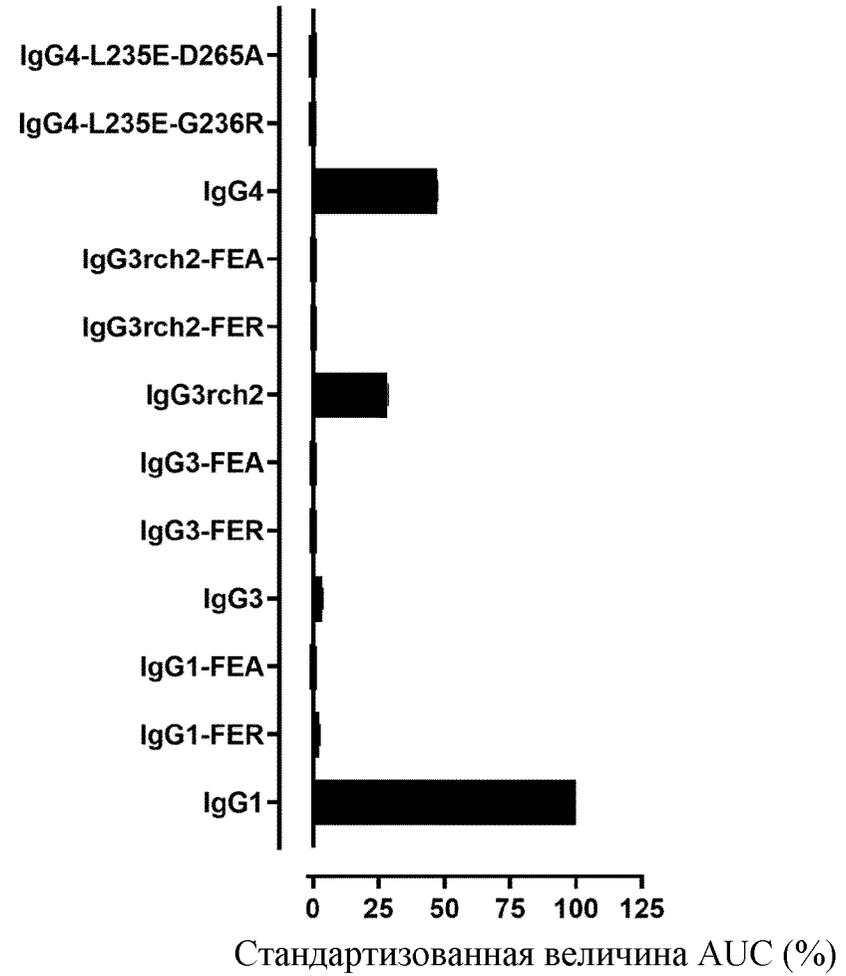


Фиг. 24 продолжение

**А** Репортерный анализ FcγR - FcγRIa

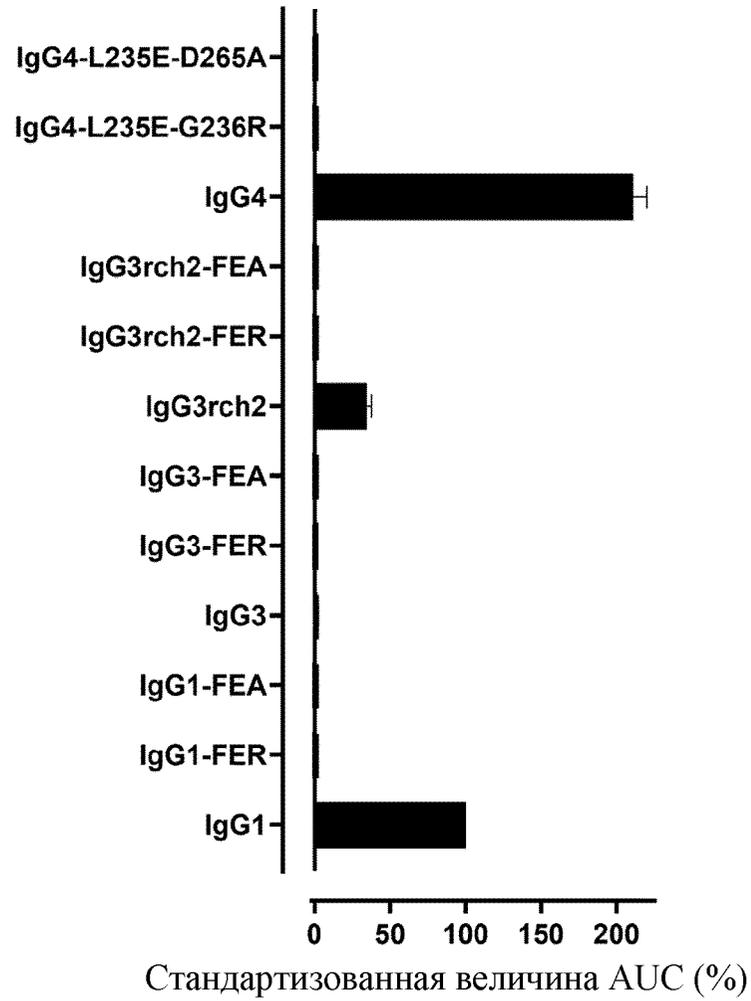


**Б** Репортерный анализ FcγR - FcγRIIa(H)

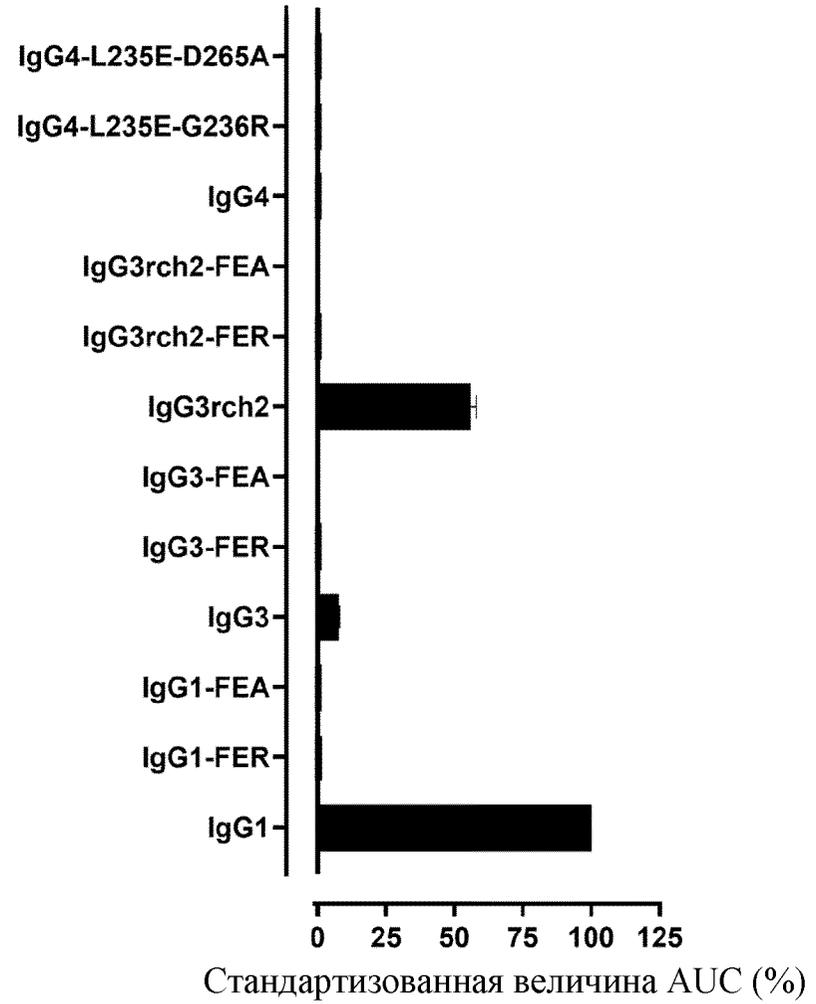


**Фиг. 25**

**В** Репортерный анализ FcγR - FcγRIIb

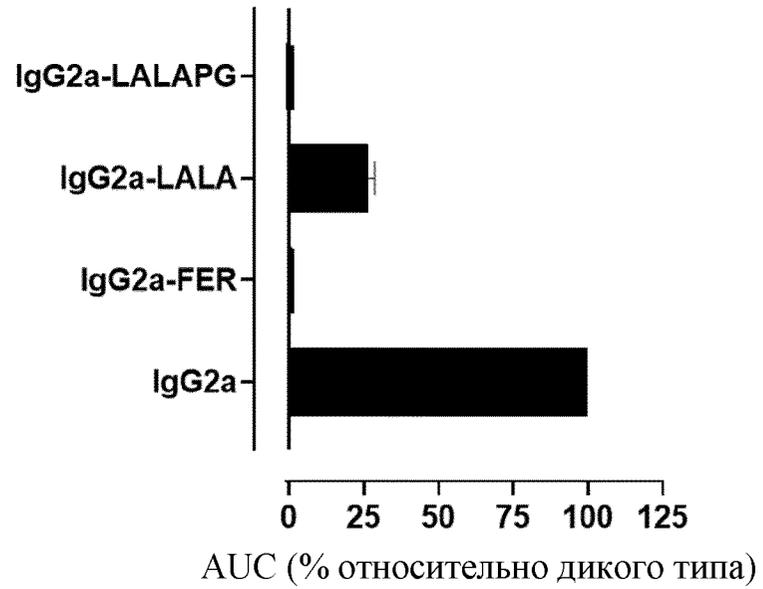


**Г** Репортерный анализ FcγR - FcγRIIIa(V)

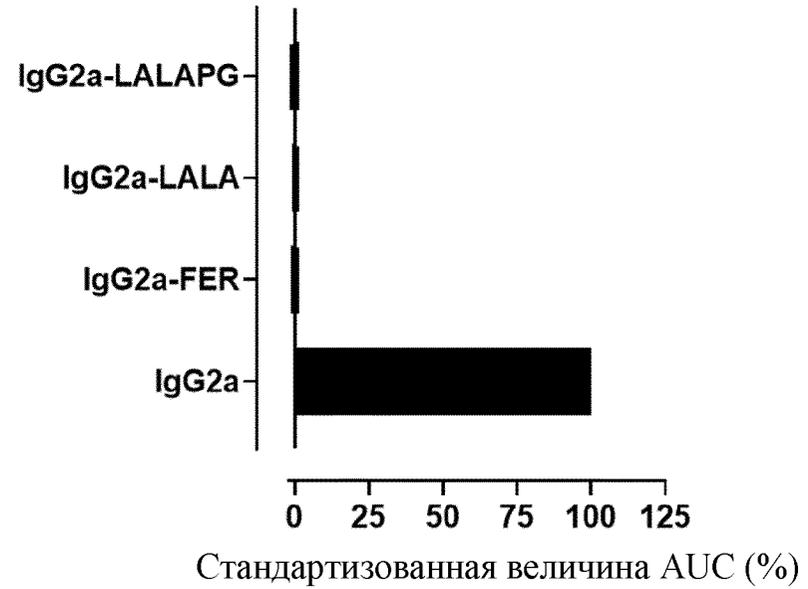


**Фиг. 25 продолжение**

**А** Репортерный анализ FcγR - FcγRIa



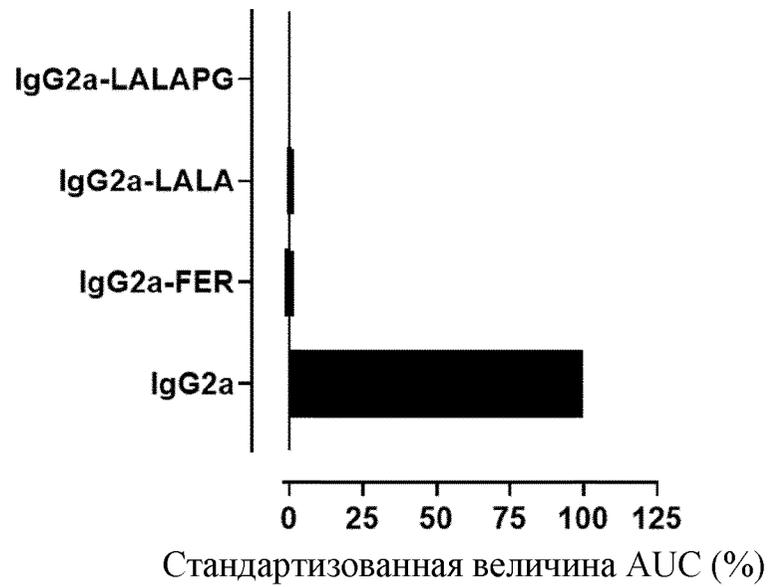
**Б** Репортерный анализ FcγR - FcγRIIa(H)



**Фиг. 26**

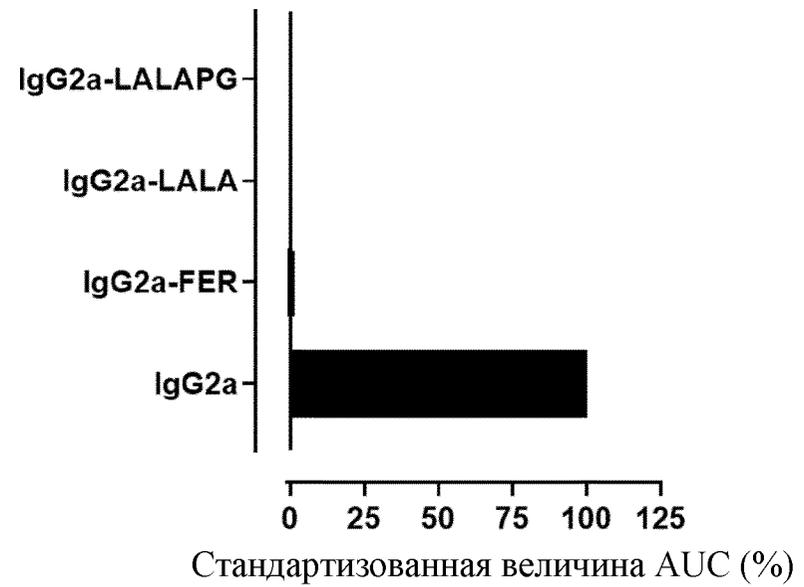
**В**

Репортерный анализ FcγR - FcγRIIb



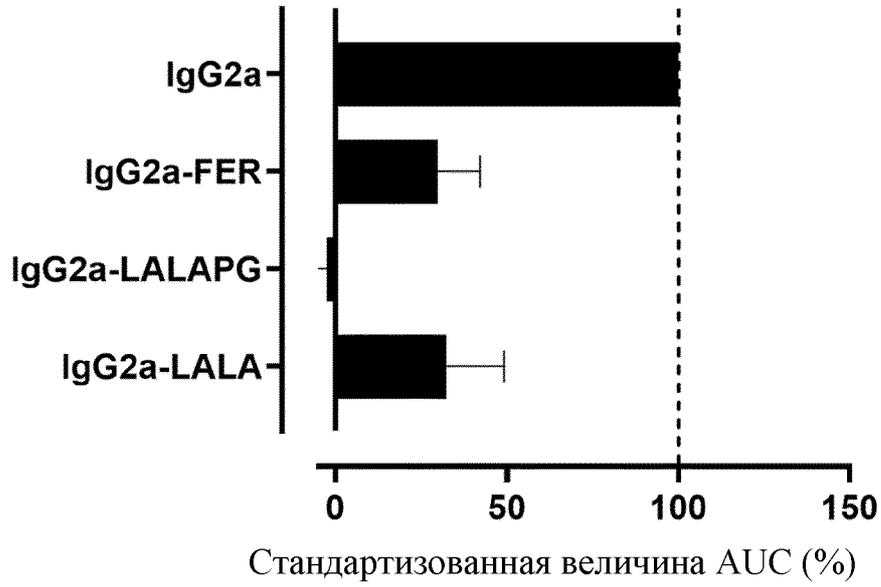
**Г**

Репортерный анализ FcγR - FcγRIIIa(V)

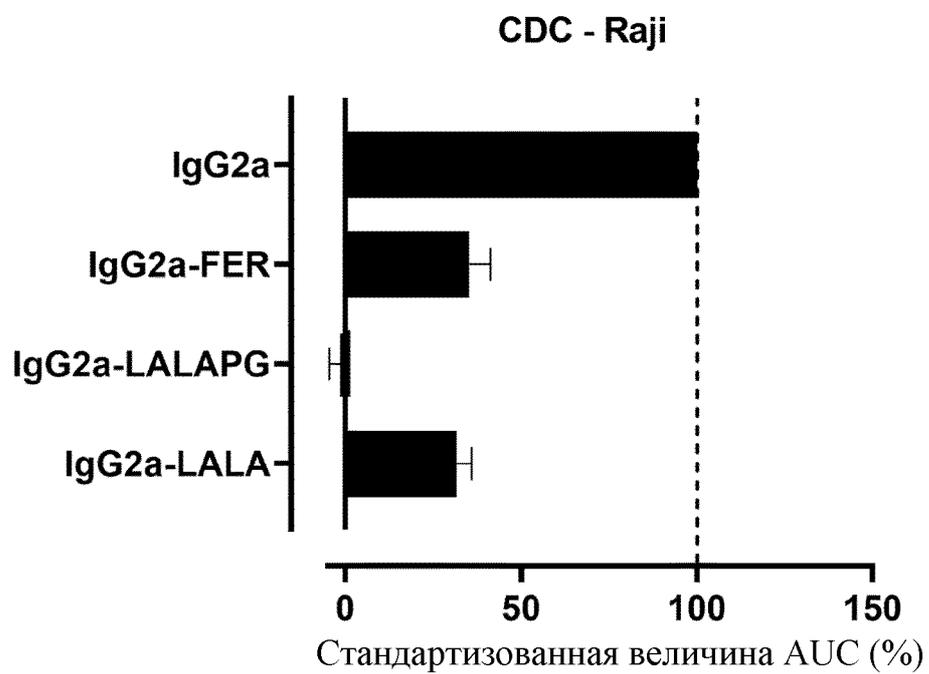


**Фиг. 26 продолжение**

Связывание C1q - Raji



Фиг. 27



**Фиг. 28**