

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202392706 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.03.08

(22) Дата подачи заявки  
2022.05.12

(51) Int. Cl. C07K 16/46 (2006.01)  
C07K 16/28 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61K 38/17 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
C12N 15/62 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)  
C07K 16/00 (2006.01)  
C12N 15/12 (2006.01)

(54) АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩАЯ МОЛЕКУЛА

(31) 202110527339.7

(32) 2021.05.14

(33) CN

(86) PCT/CN2022/092529

(87) WO 2022/237882 2022.11.17

(71) Заявитель:

ЦЗЯНСУ ХЭНЖУЙ  
ФАРМАСЬЮТИКАЛС КО.,  
ЛТД.; ШАНХАЙ ХЭНЖУЙ  
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД. (CN)

(72) Изобретатель:

Ин Хуа, Ху Циюэ, Цзинь Синьшэн,  
Ши Цзиньпин, Чжан Лин, Мао  
Ланюн, Е Синь, Тао Вэйкан (CN)

(74) Представитель:

Харин А.В., Стойко Г.В., Галухина  
Д.В., Буре Н.Н., Алексеев В.В. (RU)

(57) Предложена антигенсвязывающая молекула, в частности антитело с модифицированным доменом, где по меньшей мере один домен константной области CH1/CL антитела заменен цепью титин-Т/цепью обскурин-О.

A1

202392706

202392706

A1

## АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩАЯ МОЛЕКУЛА

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области лекарственных средств на основе антител и, в частности, включает антигенсвязывающую молекулу, в которой заменены структуры CH1 и CL, и ее применение.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Изложенное в данном документе представляет собой лишь общую информацию, относящуюся к настоящему изобретению, и необязательно может представлять собой уровень техники.

Благодаря постоянному совершенствованию технологии гуманизации антител моноклональные антитела быстро развиваются в последние годы. Различные моноклональные антитела были использованы для лечения серьезных заболеваний, таких как злокачественные опухоли и аутоиммунные заболевания. Однако ускользание опухолей от иммунного ответа часто сопровождается множеством различных механизмов, и единичное моноклональное антитело может связываться только с одной конкретной мишенью, что может значительно снизить терапевтический эффект моноклонального антитела.

Биспецифическое антитело (BsAb) представляет собой искусственное антитело, созданное путем объединения вместе антител, нацеленных на два разных антигена или два разных эпитопа, с использованием средств генной инженерии. В отличие от моноклонального антитела, биспецифическое антитело обладает способностью одновременно нацеливаться на два разных антигена или два разных эпитопа и может выполнять особые биологические функции, такие как рекрутинг иммунных клеток, совместная стимуляция или совместное ингибирование рецепторов, нейтрализация мультивалентных вирусов и т. д., и ожидается получение лучших клинических терапевтических эффектов, чем при применении единичных моноклональных антител, даже при использовании комбинации антител.

Разработан широкий спектр рекомбинантных биспецифических антител, таких как четырехвалентные биспецифические антитела, созданные путем слияния, например, антитела IgG (иммуноглобулин G) и одноцепочечного домена (см. Coloma, M.J., et al., *Nature Biotech.* 15 (1997) 159-163; Morrison, S.L., *Nature Biotech.* 25 (2007) 1233–1234). Существуют другие биспецифические формы, такие как DVD-Ig, CrossMab и BiTE (Spiess et al., *Molecular Immunology*, 67 (2), pp. 95-106 (2015)).

Также были описаны различные структурные модели для биспецифических антител, например, введение мутации по типу «выступ-во-впадину» в область Fc (Ridgway et al., Protein Engineering, 9 (7), pp. 617-621 (1996)); введение электростатической конструкции (Gunasekaran et al., Journal of Biological Chemistry, 285, (25), pp. 19637-19646, (2010)) или введение конструкции «отрицательного состояния» (Kreudenstein et al., mAbs, 5 (5), pp. 646-654 (2013); Leaver-Fay et al., Structure, 24 (4), pp. 641-651 (2016)), обмен доменами CH1 и CL (платформа CrossMab) (Schaefer et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108 (27), pp. 11187-11192 (2011)), слияние с константной областью TCR (WO2019057122A1) и т. д.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Во время получения мультиспецифического антитела случайные комбинации легких и тяжелых цепей различных антигенов приводят к образованию множества различных продуктов, только один из которых является желательным, и полученные побочные продукты включают антитело, не содержащее легкой цепи, полуантитело, полимер тяжелой цепи, неправильные спаривания легкой цепи и тяжелой цепи и тому подобное, что вызывает значительные проблемы при разработке выполняемых далее процессов. С этой целью в настоящем изобретении предложены димеризованный полипептид и антигенсвязывающая молекула, содержащая димеризованный полипептид.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к димеризованному полипептиду, который содержит цепь титин-Т и цепь обскурин-О или цепь титин-Т и цепь обскурин-подобный-О, где

i) цепь титин-Т представляет собой вариант SEQ ID NO: 32, где вариант содержит замены аминокислотных остатков в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 60 и 64, и/или

ii) цепь обскурин-О представляет собой вариант SEQ ID NO: 33, где вариант содержит замены аминокислотных остатков в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 13, 32, 48, 66, 82 и 93;

при условии, что:

a) когда вариант не содержит замены аминокислотного остатка в положении 13, 48, 66, 82 или 93 и содержит замену аминокислотного остатка в положении 32, аминокислотная замена в положении 32 не представляет собой 32P;

b) когда вариант не содержит замены аминокислотного остатка в положении 32, 48, 66, 82 или 93 и содержит замену аминокислотного остатка в положении 13, аминокислотная замена в положении 13 не представляет собой 13Y; и

с) когда вариант не содержит замены аминокислотного остатка в положении 48, 66, 82 или 93 и содержит замены аминокислотных остатков в положениях 13 и 32, замена аминокислотного остатка в положении 13 не представляет собой 13Y, и замена аминокислотного остатка в положении 32 не представляет собой 32P.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где

i) цепь титин-Т представляет собой вариант SEQ ID NO: 32, где вариант содержит замены аминокислотных остатков в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 60 и 64, и/или

ii) цепь обскурин-О представляет собой вариант SEQ ID NO: 33, где вариант содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 13S, 32F, замены аминокислотного остатка в положении 48, замены аминокислотного остатка в положении 66, замены аминокислотного остатка в положении 82 и замены аминокислотного остатка в положении 93.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где вариант SEQ ID NO: 32 содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из 60S и 64T, и/или вариант SEQ ID NO: 33 содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 13S, 32F, 48V, 66C, 82H и 93C.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где вариант SEQ ID NO: 32 содержит замены аминокислотных остатков, выбранные из группы, состоящей из 60S и 64T, и/или вариант SEQ ID NO: 33 содержит замены аминокислотных остатков, выбранные из любого из а)-с):

- a) 32F и 48V;
- b) 13S, 32F, 48V и 82H; и
- c) 13S, 32F, 48V, 66C, 82H и 93C.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к димеризованному полипептиду, который состоит из цепи титин-Т и цепи обскурин-О или цепи титин-Т и цепи обскурин-подобный-О, где

i) цепь титин-Т представляет собой вариант SEQ ID NO: 32, где вариант содержит по меньшей мере замены аминокислотных остатков в положениях 60 и/или 64 по сравнению с SEQ ID NO: 32, и/или

ii) цепь обскурин-О представляет собой вариант SEQ ID NO: 33, где вариант содержит по меньшей мере одну или более замен аминокислотных остатков в положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 13, 32, 48, 66, 82 и 93, по сравнению с SEQ



ID NO: 33;

при условии, что:

a) когда вариант не содержит замены аминокислотного остатка в положении 13, 48, 66, 82 или 93 и содержит замену аминокислотного остатка в положении 32, аминокислотная замена в положении 32 не представляет собой 32P;

b) когда вариант не содержит замены аминокислотного остатка в положении 32, 48, 66, 82 или 93 и содержит замену аминокислотного остатка в положении 13, аминокислотная замена в положении 13 не представляет собой 13Y; и

c) когда вариант не содержит замены аминокислотного остатка в положении 48, 66, 82 или 93 и содержит замены аминокислотных остатков в положениях 13 и 32, замена аминокислотного остатка в положении 13 не представляет собой 13Y, и замена аминокислотного остатка в положении 32 не представляет собой 32P.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где

i) цепь титин-Т представляет собой вариант SEQ ID NO: 32, где вариант содержит по меньшей мере одну или более замен аминокислотных остатков в положениях 60 и/или 64 по сравнению с SEQ ID NO: 32, и/или

ii) цепь обскурин-О представляет собой вариант SEQ ID NO: 33, содержащий одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 13S, 32F, замены аминокислотного остатка в положении 48, замены аминокислотного остатка в положении 66, замены аминокислотного остатка в положении 82 и замены аминокислотного остатка в положении 93, по сравнению с SEQ ID NO: 33.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где вариант SEQ ID NO: 32 содержит по меньшей мере замены аминокислотных остатков 60S и/или 64T по сравнению с SEQ ID NO: 32, и/или вариант SEQ ID NO: 33 содержит по меньшей мере одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 13S, 32F, 48V, 66C, 82H и 93C по сравнению с SEQ ID NO: 33.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где вариант SEQ ID NO: 32 содержит по меньшей мере замены аминокислотных остатков 60S и 64T по сравнению с SEQ ID NO: 32, и/или вариант SEQ ID NO: 33 содержит по меньшей мере замены аминокислотных остатков, выбранные из любого из а)-с), по сравнению с SEQ ID NO: 33:

a) 32F и 48V;

b) 13S, 32F, 48V и 82H; и

с) 13S, 32F, 48V, 66C, 82H и 93C.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где вариант SEQ ID NO: 32 дополнительно содержит замены аминокислотных остатков в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 3, 8, 11, 13, 20, 22, 25, 26, 39, 40, 42, 45, 47, 49, 56, 58, 66, 70, 75, 77, 79, 81, 82, 83 и 84, например, дополнительно содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 замен аминокислотных остатков, по сравнению с SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где вариант SEQ ID NO: 32 дополнительно содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 3W, 8C, 11I, 13L, 20C, 22M/22C, 25S, 26C, 39T, 40S, 42K, 45S, 47E, 49G, 56S, 58E, 66S/66K, 70R, 75V, 77S, 79T, 81R, 82M, 83D и 84L, по сравнению с SEQ ID NO: 32.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где вариант SEQ ID NO: 32 дополнительно содержит замены аминокислотных остатков в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 8, 11, 20, 25, 26, 39, 66, 79 и 81, по сравнению с SEQ ID NO: 32; в некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 32 дополнительно содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 8C, 11I, 20C, 25S, 26C, 39T, 66K, 79T и 81R, по сравнению с SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 32 дополнительно содержит замены аминокислотных остатков в положениях 8, 11, 25, 39, 66, 79 и 81 по сравнению с SEQ ID NO: 32; в некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 32 дополнительно содержит замены аминокислотных остатков 8C, 11I, 25S, 39T, 66K, 79T и 81R по сравнению с SEQ ID NO: 32; в некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 32 дополнительно содержит замены аминокислотных остатков 8C, 11I, 25S, 39T, 60S, 64T, 66K, 79T и 81R и замены аминокислотных остатков 20C и/или 26C по сравнению с SEQ ID NO: 32.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где вариант SEQ ID NO: 32 дополнительно содержит замены аминокислотных остатков, выбранные из любого из а)-1), по сравнению с SEQ ID NO: 32:

- а) 8C, 25S и 39T;
- б) 20C, 25S и 39T;
- с) 25S, 26C и 39T;

- d) 22C, 25S и 39T;
- e) 8C, 25S, 39T, 66S и 77S;
- f) 8C, 25S, 39T, 66K, 70R, 79T и 81R;
- g) 3W, 8C, 11I, 13L, 22M, 25S, 39T и 82M;
- h) 8C, 11I, 25S, 39T, 66K, 79T и 81R;
- i) 8C, 25S, 39T, 40S, 42K, 45S, 47E, 49G, 56S, 58E, 75V, 83D и 84L;
- j) 8C, 25S, 39T, 47E, 49G, 56S, 58E и 75V;
- k) 8C, 25S, 39T, 56S, 58E и 75V; и
- l) 8C, 25S, 39T, 56S, 58E, 66S и 77S;

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где вариант SEQ ID NO: 32 содержит замены аминокислотных остатков, выбранные из любого из а)-с), по сравнению с SEQ ID NO: 32:

- A) 8C, 11I, 25S, 39T, 60S, 64T, 66K, 79T и 81R;
- B) 8C, 11I, 20C, 25S, 39T, 60S, 64T, 66K, 79T и 81R, и
- C) 8C, 11I, 25S, 26C, 39T, 60S, 64T, 66K, 79T и 81R.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где вариант SEQ ID NO: 33 дополнительно содержит замены аминокислотных остатков в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 2, 3, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 17, 20, 22, 25, 30, 32, 34, 36, 41, 42, 44, 45, 53, 58, 62, 67, 69, 76, 88, 89, 92, 94 и 97, по сравнению с SEQ ID NO: 33; в некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 33 дополнительно содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 2E, 3C, 7K/7R, 9C, 11L, 12S, 13Y, 14T, 17E, 20L, 22M/22S, 25S, 30D, 32P, 34E, 36T, 41K, 42L, 44I, 45T, 53L, 58V, 62E/62K/62H, 67Q/67T, 69S, 76S, 88C, 89L, 92E, 94G и 97G, по сравнению с SEQ ID NO: 33.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где вариант SEQ ID NO: 33 содержит замены аминокислотных остатков, выбранные из любого из А)-R), по сравнению с SEQ ID NO: 33:

- A) 88C;
- B) 3C;
- C) 9C;
- D) 25S, 76S и 88C;
- E) 25S, 76S и 3C;
- F) 25S, 76S и 9C;
- G) 7K, 25S, 62K, 76S и 88C;
- H) 7K, 25S, 62H, 76S и 88C;

- I) 7R, 25S, 62K, 76S и 88C;
- G) 7R, 25S, 62H, 76S и 88C;
- K) 11L, 25S, 62K, 76S и 88C;
- L) 11L, 25S, 62H, 76S и 88C;
- M) 12S, 13Y, 14T, 22S, 25S, 62K, 76S и 88C;
- N) 2E, 11L, 17E, 25S, 30D, 32P, 34E, 36T, 44I, 45T, 58V, 62E, 67Q, 69S, 76S, 88C и 97G;
- O) 11L, 20L, 22M, 25S, 53L, 62K, 76S и 88C;
- P) 11L, 25S, 41K, 45T, 62K, 67Q, 69S, 76S, 88C и 89L;
- Q) 11L, 25S, 42L, 45T, 62K, 67T, 69S, 76S, 88C, 92E и 94G; и
- R) 11L, 12S, 13Y, 22S, 25S, 42L, 45T, 62K, 67Q, 69S, 76S, 88C, 92E и 94G.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где вариант SEQ ID NO: 33 дополнительно содержит замены аминокислотных остатков в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 3, 9, 25, 41, 45, 62, 67, 69, 76, 88 и 89, по сравнению с SEQ ID NO: 33; в некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 33 дополнительно содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 3C, 9C, 25S, 41K, 45T, 62K, 67Q, 69S, 76S, 88C и 89L, по сравнению с SEQ ID NO: 33.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где вариант SEQ ID NO: 33 дополнительно содержит замены аминокислотных остатков в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 41, 45, 62, 67, 69, 88 и 89, по сравнению с SEQ ID NO: 33; в некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 33 дополнительно содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 41K, 45T, 62K, 67Q, 69S, 88C и 89L, по сравнению с SEQ ID NO: 33; в некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 33 содержит замены аминокислотных остатков 41K, 45T, 62K, 67Q, 69S, 88C и 89L.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где вариант SEQ ID NO: 33 содержит замены аминокислотных остатков 13S, 32F, 48V и 82H и одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 3C, 9C, 25S, 41K, 45T, 62K, 67Q, 69S, 76S, 88C и 89L, по сравнению с SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 33 дополнительно содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 41K, 45T, 62K, 67Q, 69S и 89L, например, содержит замены аминокислотных остатков 41K, 45T, 62K, 67Q, 69S и 89L, по сравнению с SEQ ID

NO: 33; в некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 33 дополнительно содержит замены аминокислотных остатков в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из 3C, 9C, 25S, 66C, 76S, 88C и V93C, например, содержит замены аминокислотных остатков, выбранные из любого из а)-j), по сравнению с SEQ ID NO: 33: а) 25S, 76S и 88C; б) 3C, 25S, 76S и 88C; в) 9C, 25S, 76S и 88C; д) 88C; е) 3C и 88C; ф) 9C и 88C; г) 25S, 66C, 76S, 88C и 93C; h) 9C, 25S, 66C, 76S, 88C и 93C; и) 3C, 25S, 66C, 76S, 88C, и 93C; и j) 3C, 9C, 25S, 66C, 76S и 93C.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где вариант SEQ ID NO: 33 дополнительно содержит замены аминокислотных остатков в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 25, 41, 45, 62, 67, 69, 76, 88 и 89, по сравнению с SEQ ID NO: 33; в некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 33 дополнительно содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 25S, 41K, 45T, 62K, 67Q, 69S, 76S, 88C и 89L, по сравнению с SEQ ID NO: 33.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где вариант SEQ ID NO: 33 содержит замены аминокислотных остатков, выбранные из любого из а)-j), по сравнению с SEQ ID NO: 33:

- а) 25S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 67Q, 69S, 76S, 88C и 89L;
- б) 13S, 25S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 67Q, 69S, 76S, 82H, 88C и 89L;
- в) 3C, 13S, 25S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 67Q, 69S, 76S, 82H, 88C и 89L;
- д) 9C, 13S, 25S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 67Q, 69S, 76S, 82H, 88C и 89L;
- е) 13S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 67Q, 69S, 82H, 88C и 89L;
- ф) 3C, 13S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 67Q, 69S, 82H, 88C и 89L;
- г) 9C, 13S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 67Q, 69S, 82H, 88C и 89L;
- h) 13S, 25S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 66C, 67Q, 69S, 76S, 82H, 88C, 89L и 93C;
- и) 3C, 13S, 25S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 66C, 67Q, 69S, 76S, 82H, 88C, 89L и 93C; и
- j) 9C, 13S, 25S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 66C, 67Q, 69S, 76S, 82H, 88C, 89L и 93C.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где цепь обскурин-подобный-О представляет собой SEQ ID NO: 34 или ее вариант, где вариант SEQ ID NO: 34 содержит замены аминокислотных остатков в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 6, 26, 74, 77, 84 и 86, по сравнению с SEQ ID NO: 34; положения замен аминокислотных остатков варианта SEQ ID NO: 34 представляют собой положения согласно нумерации естественной последовательности относительно последовательности SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 34 содержит

одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 6E, 26S, 74C, 77S, 84C и 86C, по сравнению с SEQ ID NO: 33; в некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 34 содержит замены аминокислотных остатков, выбранные из любого из A)-F), по сравнению с SEQ ID NO: 33:

- A) 6E и 74C;
- B) 6E и 84C;
- C) 6E и 86C;
- D) 6E, 26S, 77S и 74C;
- E) 6E, 26S, 77S и 84C; и
- F) 6E, 26S, 77S и 86C.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где цепь титин-Т представляет собой вариант SEQ ID NO: 32, 68 или 127, где вариант содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 60S и 64T, и цепь обскурин-О представляет собой вариант SEQ ID NO: 33, 80 или 128, и вариант имеет одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 13S, 32F, 48V, 66C, 82H и 93C. Положения остатков в цепи титин-Т представляют собой положения согласно нумерации естественных последовательностей относительно последовательности SEQ ID NO: 32; положения остатков в цепи обскурин-О представляют собой положения согласно нумерации естественных последовательностей относительно последовательности SEQ ID NO: 33.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где цепь титин-Т представляет собой вариант SEQ ID NO: 32, 68 или 127, где вариант и содержит замены аминокислотных остатков, выбранные из группы, состоящей из 60S и/или 64T, по сравнению с SEQ ID NO: 32, 68 или 127; цепь обскурин-О представляет собой вариант SEQ ID NO: 33, 80 или 128, где вариант содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 13S, 32F, 48V, 66C, 82H и 93C, по сравнению с SEQ ID NO: 33, 80 или 128. Положения аминокислотных остатков в цепи титин-Т представляют собой положения согласно нумерации естественных последовательностей относительно последовательности SEQ ID NO: 32; положения аминокислотных остатков в цепи обскурин-О представляют собой положения согласно нумерации естественных последовательностей относительно последовательности SEQ ID NO: 33.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где цепь титин-Т имеет по меньшей мере 85%

(например, по меньшей мере 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичность последовательности с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 132-141, и цепь обскурин-О имеет по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичность последовательности с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 129-131. В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где цепь титин-Т имеет аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 129-131, и цепь обскурин-О имеет аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 132-141. В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где цепь титин-Т имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 129, и цепь обскурин-О имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 133; или цепь титин-Т имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 129, и цепь обскурин-О имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 135; или цепь титин-Т имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 129, и цепь обскурин-О имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 136.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где цепь титин-Т способна связываться с цепью обскурин-О с образованием димеризованного полипептида; в некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где цепь титин-Т способна связываться с цепью обскурин-подобный-О с образованием димеризованного полипептида.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где один или более остатков в положениях 7-15, 19-24, 26, 55, 59 и 60 в цепи титин-Т связаны с одним или более остатками в положениях 3-6, 9, 41, 73, 75 и 80-90 в цепи обскурин-О, и один или более остатков в положениях 1, 7-10, 13-16, 19-26, 59-60 и 96 в цепи титин-Т связаны с одним или более остатками в положениях 4-5, 10, 12-13, 74, 76, 78 и 82-91 в цепи обскурин-подобный-О. В некоторых вариантах осуществления цепь титин-Т содержит аминокислоты в положениях 7-60 SEQ ID NO: 32 и/или дополнительно содержит замены аминокислотных остатков в соответствующих положениях согласно любому из вышеперечисленного; цепь обскурин-О содержит аминокислоты в положениях 3-90 SEQ ID NO: 33 и/или дополнительно содержит аминокислотные остатки в положениях согласно любому из вышеперечисленного. В

некоторых вариантах осуществления цепь титин-Т содержит аминокислоты в положениях 1-96 SEQ ID NO: 32 и/или дополнительно содержит замены аминокислотных остатков в соответствующих положениях согласно любому из вышеперечисленного; цепь обскурин-подобный-О содержит аминокислоты в положениях 4-91 SEQ ID NO: 34 и/или дополнительно содержит аминокислотные остатки в положениях согласно любому из вышеперечисленного.

Предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где положения остатков в цепи титин-Т представляют собой положения согласно нумерации естественных последовательностей относительно последовательности SEQ ID NO: 32; положения остатков в цепи обскурин-О представляют собой положения согласно нумерации естественных последовательностей относительно последовательности SEQ ID NO: 33; положения остатков в цепи обскурин-подобный-О представляют собой положения согласно нумерации естественных последовательностей относительно последовательности SEQ ID NO: 34.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, где цепь титин-Т, описанная выше, содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 60S и 64T в SEQ ID NO: 32, 68 или 127, и цепь обскурин-О содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 13S, 32F, 48V, 66C, 82H и 93C в SEQ ID NO: 33, 80 или 128. Положения остатков в цепи титин-Т представляют собой положения согласно нумерации естественных последовательностей относительно последовательности SEQ ID NO: 32; положения остатков в цепи обскурин-О представляют собой положения согласно нумерации естественных последовательностей относительно последовательности SEQ ID NO: 33.

В некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 32 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 32 содержит только замены аминокислотных остатков согласно любому из вышеперечисленного по сравнению с SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 33 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 33 содержит только замены аминокислотных остатков согласно любому из вышеперечисленного по сравнению с SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 34 содержит аминокислотную последовательность,



имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 34 содержит только замены аминокислотных остатков согласно любому из вышеперечисленного по сравнению с SEQ ID NO: 34.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающей молекуле, которая содержит димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула согласно любому из вышеперечисленного, которая содержит первый антигенсвязывающий фрагмент, содержащий Fab с модифицированным доменом, содержащий переменную область тяжелой цепи VH1, переменную область легкой цепи VL1 и димеризованный полипептид, но не содержащий константную область легкой цепи CL и константную область тяжелой цепи CH1, где каждая из VH1 и VL1 связана с любой из пептидных цепей димеризованного полипептида посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления С-конец VH1 слит с N-концом цепи титин-Т посредством линкера, и С-конец VL1 слит с N-концом цепи обскурин-О или цепи обскурин-подобный-О посредством линкера; в некоторых вариантах осуществления С-конец VL1 слит с N-концом цепи титин-Т посредством линкера, и С-конец VH1 слит с N-концом цепи обскурин-О или цепи обскурин-подобный-О посредством линкера.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающей молекуле, которая содержит димеризованный полипептид согласно любому из вышеперечисленного, который заменяет константную область легкой цепи CL и константную область тяжелой цепи CH1.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула согласно любому из вышеперечисленного, которая содержит первый антигенсвязывающий фрагмент, содержащий Fab с модифицированным доменом, содержащий переменную область тяжелой цепи VH1, переменную область легкой цепи VL1 и димеризованный полипептид, описанный выше, где каждая из VH1 и VL1 связана с любой из пептидных цепей димеризованного полипептида посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления С-конец VH1 слит с N-концом цепи титин-Т посредством линкера, и С-конец VL1 слит с N-концом цепи обскурин-О или цепи обскурин-подобный-О посредством линкера; в некоторых вариантах осуществления С-конец VL1 слит с N-концом цепи титин-Т посредством линкера, и С-конец VH1 слит с N-концом цепи обскурин-О или цепи обскурин-подобный-О посредством линкера.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула

согласно любому из вышеперечисленного, которая содержит первый антигенсвязывающий фрагмент, содержащий:

а. пептидную цепь [VH1]-[линкер 1]-[цепь титин-Т] в порядке от N-конца к С-концу и пептидную цепь [VL1]-[линкер 2]-[цепь обскурин-О или цепь обскурин-подобный-О] в порядке от N-конца к С-концу; или

б. пептидную цепь [VH1]-[линкер 1]-[цепь обскурин-О или цепь обскурин-подобный-О] в порядке от N-конца к С-концу и пептидную цепь [VL1]-[линкер 2]-[цепь титин-Т] в порядке от N-конца к С-концу;

где линкер 1 и линкер 2 являются идентичными или различными. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой гибкий пептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер имеет длину 3-15 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления: А) линкер 1 и линкер 2 оба представляют собой линкеры  $(G_xS)_y$ , где  $x$  выбран из группы, состоящей из целых чисел от 1 до 5 (например, 1, 2, 3, 4 или 5), и  $y$  выбран из группы, состоящей из целых чисел от 0 до 6 (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6), где, когда  $y$  равен 0, линкер представляет собой связь, или В) линкер 1 представляет собой С-концевую усеченную последовательность СН1, и линкер 2 представляет собой С-концевую усеченную последовательность СL. В некоторых других вариантах осуществления, где: А) линкер 1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 173; линкер 2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 174; или В) линкер 1 и линкер 2 оба имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 175; или С) линкер 1 и линкер 2 оба имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 176.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающей молекуле, содержащей первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент, где первый антигенсвязывающий фрагмент является таким, как определено выше, второй антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи VH2 и переменную область легкой цепи VL2, и первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент связываются с различными антигенами или различными эпитопами на одном и том же антигене;

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab.

В некоторых вариантах осуществления, где антигенсвязывающая молекула дополнительно содержит область Fc, указанная область Fc содержит первую субъединицу Fc1 и вторую субъединицу Fc2, способные связываться друг с другом; в некоторых

вариантах осуществления область Fc представляет собой область Fc IgG; в некоторых вариантах осуществления область Fc представляет собой область Fc IgG<sub>1</sub>; в некоторых вариантах осуществления область Fc содержит одну или более аминокислотных замен, которые снижают гомодимеризацию; и/или область Fc содержит одну или более аминокислотных замен, способных уменьшать связывание области Fc с Fc-рецептором. В некоторых вариантах осуществления область Fc имеет мутацию YTE (M252Y, S254T и T256E), мутации L234A и L235A и/или мутацию S228P, где мутации пронумерованы в соответствии с индексом EU. В некоторых вариантах осуществления Fc содержит первую субъединицу и вторую субъединицу, способные связываться друг с другом, где первая субъединица и/или вторая субъединица содержат одну или более аминокислотных замен, которые снижают гомодимеризацию. В некоторых вариантах осуществления первая субъединица имеет структуру выступа в соответствии с методом «выступ-во-впадину», и вторая субъединица имеет структуру впадины в соответствии с методом «выступ-во-впадину», или первая субъединица имеет структуру впадины в соответствии с методом «выступ-во-впадину», и вторая субъединица имеет структуру выступа в соответствии с методом «выступ-во-впадину». В некоторых вариантах осуществления первая субъединица содержит одну или более аминокислотных замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из 354, 356, 358 и 366, и вторая субъединица содержит одну или более аминокислотных замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из 349, 356, 358, 366, 368 и 407; в некоторых вариантах осуществления вторая субъединица содержит одну или более аминокислотных замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из 354, 356, 358 и 366, и первая субъединица содержит одну или более аминокислотных замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из 349, 356, 358, 366, 368 и 407. В некоторых вариантах осуществления первая субъединица содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из 354C, 356E, 358M и 366W, и вторая субъединица содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из 349C, 356E, 358M, 366S, 368A и 407V. В некоторых вариантах осуществления вторая субъединица содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из 354C, 356E, 358M и 366W, и первая субъединица содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из 349C, 356E, 358M, 366S, 368A и 407V. В некоторых вариантах осуществления первая субъединица содержит аминокислотные замены 354C, 356E, 358M и 366W, и вторая субъединица содержит аминокислотные замены 349C, 356E, 358M, 366S, 368A и 407V. В некоторых вариантах осуществления вторая субъединица содержит аминокислотные замены 354C, 356E, 358M и 366W, и первая субъединица содержит аминокислотные замены 349C, 356E, 358M, 366S,

368A и 407V. В некоторых вариантах осуществления Fc1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 177, и Fc2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 178; или Fc2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 177, и Fc1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 178.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула согласно любому из вышеперечисленного, которая содержит первую тяжелую цепь, первую легкую цепь, вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, где

а. первая тяжелая цепь содержит [VH1]-[линкер 1]-[цепь титин-Т]-[линкер 3]-[Fc1] в порядке от N-конца к C-концу,

первая легкая цепь содержит [VL1]-[линкер 2]-[цепь обскурин-О или цепь обскурин-подобный-О] в порядке от N-конца к C-концу,

вторая тяжелая цепь содержит [VH2]-[CH1]-[Fc2] в порядке от N-конца к C-концу, и вторая легкая цепь содержит [VL2]-[CL] в порядке от N-конца к C-концу; или

б. первая тяжелая цепь содержит [VH1]-[линкер 1]-[цепь обскурин-О или цепь обскурин-подобный-О]-[линкер 3]-[Fc1] в порядке от N-конца к C-концу,

первая легкая цепь содержит [VL1]-[линкер 2]-[цепь титин-Т] в порядке от N-конца к C-концу,

вторая тяжелая цепь содержит [VH2]-[CH1]-[Fc2] в порядке от N-конца к C-концу, и вторая легкая цепь содержит [VL2]-[CL] в порядке от N-конца к C-концу;

где линкер 1, линкер 2 и линкер 3 являются идентичными или различными. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой гибкий пептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер имеет длину 3-15 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления каждая из Fc1 и Fc2 независимо содержит одну или более аминокислотных замен, которые снижают гомодимеризацию. В некоторых вариантах осуществления предложены линкер 1, линкер 2 и линкер 3, где: А) линкер 1, линкер 2 и линкер 3 все представляют собой линкеры  $(G_xS)_y$ , где  $x$  выбран из группы, состоящей из целых чисел от 1 до 5 (например, 1, 2, 3, 4 или 5), и  $y$  выбран из группы, состоящей из целых чисел от 0 до 6 (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6), (где: когда  $y$  равен 0, линкер представляет собой связь); или В) линкер 1 представляет собой C-концевую усеченную последовательность CH1, линкер 2 представляет собой C-концевую усеченную последовательность CL, и линкер 3 представляет собой линкер  $(G_xS)_y$ , где  $x$  выбран из группы, состоящей из целых чисел от 1 до 5 (например, 1, 2, 3, 4 или 5), и  $y$  выбран из группы, состоящей из целых чисел от 0 до 6 (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6). В некоторых вариантах осуществления линкер 3 представляет собой связь, и линкер 1 и линкер 2 представляют собой: А) линкер 1, имеющий последовательность, представленную

в SEQ ID NO: 173; и линкер 2, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 174; или В) линкер 1 и линкер 2, оба из которых имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 175; или С) линкер 1 и линкер 2, оба из которых имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 176. В некоторых вариантах осуществления Fc1 имеет структуру выступа в соответствии с методом «выступ-во-впадину», и Fc2 имеет структуру впадины в соответствии с методом «выступ-во-впадину», или Fc1 имеет структуру впадины в соответствии с методом «выступ-во-впадину», и Fc2 имеет структуру выступа в соответствии с методом «выступ-во-впадину». В некоторых вариантах осуществления Fc1 содержит одну или более аминокислотных замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из 354, 356, 358 и 366, и Fc2 содержит одну или более аминокислотных замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из 349, 356, 358, 366, 368 и 407. В некоторых вариантах осуществления Fc2 содержит одну или более аминокислотных замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из 354, 356, 358 и 366, и Fc1 содержит одну или более аминокислотных замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из 349, 356, 358, 366, 368 и 407. В некоторых вариантах осуществления Fc1 содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из 354С, 356Е, 358М и 366W, и Fc2 содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из 349С, 356Е, 358М, 366S, 368А и 407V. В некоторых вариантах осуществления Fc2 содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из 354С, 356Е, 358М и 366W, и Fc1 содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из 349С, 356Е, 358М, 366S, 368А и 407V. В некоторых вариантах осуществления Fc1 содержит аминокислотные замены 354С, 356Е, 358М и 366W, и Fc2 содержит аминокислотные замены 349С, 356Е, 358М, 366S, 368А и 407V. В некоторых вариантах осуществления Fc2 содержит аминокислотные замены 354С, 356Е, 358М и 366W, и Fc1 содержит аминокислотные замены 349С, 356Е, 358М, 366S, 368А и 407V. В некоторых вариантах осуществления Fc1 представлена в SEQ ID NO: 177, и Fc2 представлена в SEQ ID NO: 178; или Fc2 представлена в SEQ ID NO: 177, и Fc1 представлена в SEQ ID NO: 178.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула согласно любому из вышеперечисленного представляет собой мультиспецифическое антитело.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула согласно любому из вышеперечисленного представляет собой биспецифическое антитело, триспецифическое антитело или тетраспецифическое антитело.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула согласно любому из вышеперечисленного представляет собой биспецифическое антитело.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула согласно любому из вышеперечисленного отличается тем, что:

(I) антигенсвязывающая молекула способна связываться с NGF и RANKL; в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула содержит первую тяжелую цепь, первую легкую цепь, вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, где:

первая тяжелая цепь содержит [VH1]-[линкер 1]-[цепь обскурин-О]-[линкер 3]-[Fc1] в порядке от N-конца к C-концу,

первая легкая цепь содержит [VL1]-[линкер 2]-[цепь титин-Т] в порядке от N-конца к C-концу,

вторая тяжелая цепь содержит [VH2]-[CH1]-[Fc2] в порядке от N-конца к C-концу, и

вторая легкая цепь содержит [VL2]-[CL] в порядке от N-конца к C-концу; где VH1 образует с VL1 первый антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с NGF, и VH2 образует с VL2 второй антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с RANKL; или

VH1 образует с VL1 первый антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с RANKL, и VH2 образует с VL2 второй антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с NGF;

в некоторых вариантах осуществления VH1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, VL1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, VH2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, и VL2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25; или

VH1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, VL1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25, VH2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, и VL2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27;

и цепь обскурин-О имеет последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 132-141, и цепь титин-Т имеет последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 129-131;

в некоторых вариантах осуществления Fc1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 177; Fc2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 178; CH1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 179; CL имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4; линкер 3 представляет собой связь; линкер 1 и линкер 2 выбраны из группы, состоящей из: а) линкера 1 и линкера 2, оба из которых имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 175; и б) линкера 1, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 173, и линкера 2, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 174;

(II) антигенсвязывающая молекула способна связываться с PDL1 и CTLA4; в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула содержит первую тяжелую цепь, первую легкую цепь, вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, где:

первая тяжелая цепь содержит [VH1]-[линкер 1]-[цепь обскурин-О]-[линкер 3]-[Fc1] в порядке от N-конца к C-концу,

первая легкая цепь содержит [VL1]-[линкер 2]-[цепь титин-Т] в порядке от N-конца к C-концу,

вторая тяжелая цепь содержит [VH2]-[CH1]-[Fc2] в порядке от N-конца к C-концу, и вторая легкая цепь содержит [VL2]-[CL] в порядке от N-конца к C-концу; где VH1 образует с VL1 первый антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с PDL1, и VH2 образует с VL2 второй антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с CTLA4; или

VH1 образует с VL1 первый антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с CTLA4, и VH2 образует с VL2 второй антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с PDL1;

в некоторых вариантах осуществления VH1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 156, VL1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 155, VH2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 169, и VL2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 170; или

VH1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 169, VL1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 170, VH2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 156, и VL2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 155;

и цепь обскурин-О имеет последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 132-141, и цепь титин-Т имеет последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 129-131;

в некоторых вариантах осуществления Fc1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 178; Fc2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 177; CH1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 179; CL имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4; линкер 3 представляет собой связь; линкер 1 и линкер 2 выбраны из группы, состоящей из: а) линкера 1 и линкера 2, оба из которых имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 175; и б) линкера 1, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 173, и линкера 2, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 174; или

(III) антигенсвязывающая молекула способна связываться с IL5 и TSLP; в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула содержит первую тяжелую цепь,

первую легкую цепь, вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, где:

первая тяжелая цепь содержит [VH1]-[линкер 1]-[цепь титин-Т]-[линкер 3]-[Fc1] в порядке от N-конца к C-концу;

первая легкая цепь содержит [VL1]-[линкер 2]-[цепь обскурин-О] в порядке от N-конца к C-концу;

вторая тяжелая цепь содержит [VH2]-[CH1]-[Fc2] в порядке от N-конца к C-концу, и вторая легкая цепь содержит [VL2]-[CL] в порядке от N-конца к C-концу; где:

VH1 образует с VL1 первый антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с IL5, и VH2 образует с VL2 второй антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с TSLP; или

VH1 образует с VL1 первый антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с TSLP, и VH2 образует с VL2 второй антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с IL5;

в некоторых вариантах осуществления VH1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, VL1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, VH2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 171, и VL2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 172; или

VH1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 171, VL1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 172, VH2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, и VL2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17;

и цепь обскурин-О имеет последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 132-141, и цепь титин-Т имеет последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 129-131;

в некоторых вариантах осуществления Fc1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 178; Fc2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 177; CH1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 179; CL имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4; линкер 3 представляет собой связь; линкер 1 и линкер 2 выбраны из группы, состоящей из: а) линкера 1 и линкера 2, оба из которых имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 175; и б) линкера 1, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 173, и линкера 2, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 174.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула согласно любому из вышеперечисленного, которая содержит:

а. первую тяжелую цепь, содержащую [VH1]-[линкер 1]-[цепь титин-Т]-[линкер 3]-[VH2]-[CH1]-[Fc1] в порядке от N-конца к C-концу;

вторую тяжелую цепь, содержащую [VH1]-[линкер 1]-[цепь титин-Т]-[линкер 3]-



[VH2]-[CH1]-[Fc2] в порядке от N-конца к C-концу;

первую легкую цепь, содержащую [VL1]-[линкер 2]-[цепь обскурин-О или цепь обскурин-подобный-О] в порядке от N-конца к C-концу, и

вторую легкую цепь, содержащую [VL2]-[CL] в порядке от N-конца к C-концу; или

b. первую тяжелую цепь, содержащую [VH1]-[линкер 1]-[цепь обскурин-О или цепь обскурин-подобный-О]-[линкер 3]-[VH2]-[CH1]-[Fc1] в порядке от N-конца к C-концу,

вторую тяжелую цепь, содержащую [VH1]-[линкер 1]-[цепь обскурин-О или цепь обскурин-подобный-О]-[линкер 3]-[VH2]-[CH1]-[Fc2] в порядке от N-конца к C-концу;

первую легкую цепь, содержащую [VL1]-[линкер 2]-[цепь титин-Т] в порядке от N-конца к C-концу, и

вторую легкую цепь, содержащую [VL2]-[CL] в порядке от N-конца к C-концу;

где линкер 1, линкер 2 и линкер 3 являются идентичными или различными; в некоторых вариантах осуществления линкер 1, линкер 2 и линкер 3 представляют собой А) или В):

А) линкер 1, линкер 2 и линкер 3 все представляют собой  $(G_xS)_y$ , где  $x$  выбран из группы, состоящей из целых чисел от 1 до 5, и  $y$  выбран из группы, состоящей из целых чисел от 0 до 6, и

В) линкер 1 представляет собой C-концевую усеченную последовательность CH1, линкер 2 представляет собой C-концевую усеченную последовательность CL, и линкер 3 представляет собой линкер  $(G_xS)_y$ , где  $x$  выбран из группы, состоящей из целых чисел от 1 до 5, и  $y$  выбран из группы, состоящей из целых чисел от 0 до 6.

В некоторых вариантах осуществления линкер 1, линкер 2 и линкер 3 выбраны из любого из А)-С):

А) линкер 1, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 173; линкер 2, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 174; линкер 3, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 175 или SEQ ID NO: 176,

В) линкер 1, линкер 2 и линкер 3, все из которых имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 175, и

С) линкер 1, линкер 2 и линкер 3, все из которых имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 176.

В некоторых вариантах осуществления каждая из Fc1 и Fc2 независимо содержит одну или более аминокислотных замен, которые снижают гомодимеризацию. В некоторых вариантах осуществления Fc1 и Fc2 являются идентичными. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула содержит 1 первую тяжелую цепь и 1 вторую тяжелую цепь, а также 2 первые легкие цепи и 2 вторые легкие цепи, где первая тяжелая

цепь и вторая тяжелая цепь имеют идентичные аминокислотные последовательности.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула специфически связывается с PDL1 и TIGIT. В некоторых вариантах осуществления первый антиген представляет собой PDL1, а второй антиген представляет собой TIGIT. В некоторых вариантах осуществления первый антиген представляет собой TIGIT, а второй антиген представляет собой PDL1. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула содержит первый антигенсвязывающий фрагмент, способный специфически связываться с PDL1, и второй антигенсвязывающий фрагмент, способный специфически связываться с TIGIT, где первый антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи VH1 и переменную область легкой цепи VL1, и второй антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи VH2 и переменную область легкой цепи VL2; где:

VH1 содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164 и SEQ ID NO: 165, соответственно, и VL1 содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167 и SEQ ID NO: 168, соответственно; и/или

VH2 содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158 и SEQ ID NO: 159, соответственно, и VL2 содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161 и SEQ ID NO: 162, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления VH1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 156, или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, имеет по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичность последовательности с SEQ ID NO: 156, и VL1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 155, или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичность последовательности с SEQ ID NO: 155; и/или

VH2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 154, или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичность последовательности с SEQ ID NO: 154, и VL2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 153, или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичность последовательности с SEQ ID NO: 153.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула содержит:

тяжелую цепь, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 148,

или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 148; первую легкую цепь, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 146, или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 146; и вторую легкую цепь, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 147, или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 147; в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула имеет 2 указанные тяжелые цепи, 2 указанные первые легкие цепи и 2 указанные вторые легкие цепи.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающей молекуле, которая содержит первый антигенсвязывающий фрагмент, способный специфически связываться с PDL1, и второй антигенсвязывающий фрагмент, способный специфически связываться с TIGIT, где первый антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи VH1 и переменную область легкой цепи VL1, и второй антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи VH2 и переменную область легкой цепи VL2; где:

VH1 содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164 и SEQ ID NO: 165, соответственно, и VL1 содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167 и SEQ ID NO: 168, соответственно; и/или

VH2 содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158 и SEQ ID NO: 159, соответственно, и VL2 содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161 и SEQ ID NO: 162, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления VH1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 156, или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, имеет по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичность последовательности с SEQ ID NO: 156, и VL1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 155, или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичность последовательности с SEQ ID NO: 155; и/или

VH2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 154, или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичность последовательности с SEQ ID NO: 154, и VL2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 153, или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 90%,

91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичность последовательности с SEQ ID NO: 153.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула содержит: тяжелую цепь, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 148, или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 148; первую легкую цепь, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 146, или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 146; и вторую легкую цепь, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 147, или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 147. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула имеет 2 тяжелые цепи, 2 первые легкие цепи и 2 вторые легкие цепи.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу с модифицированным доменом, которое представляет собой антитело, в котором константная область тяжелой цепи CH1 и константная область легкой цепи CL заменены димеризованным полипептидом согласно любому из вышеперечисленного. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело с модифицированным доменом, в котором константная область тяжелой цепи CH1 заменена цепью титин-Т, и константная область легкой цепи CL заменена цепью обскурин-О. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело с модифицированным доменом, в котором константная область легкой цепи CL заменена цепью титин-Т, и константная область тяжелой цепи CH1 заменена цепью обскурин-О. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело с модифицированным доменом, в котором константная область тяжелой цепи CH1 заменена цепью титин-Т, и константная область легкой цепи CL заменена цепью обскурин-подобный-О. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело с модифицированным доменом, в котором константная область легкой цепи CL заменена цепью титин-Т, и константная область тяжелой цепи CH1 заменена обскурин-подобной О цепью.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, которая содержит антигенсвязывающую молекулу или антитело с модифицированным доменом в соответствии с любым из вышеперечисленного и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или эксципиентов.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению димеризованного полипептида согласно любому из вышеперечисленного для

восстановления неправильных спариваний легкая цепь/тяжелая цепь антитела.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению димеризованного полипептида согласно любому из вышеперечисленного для восстановления неправильных спариваний легкая цепь/тяжелая цепь антитела во время получения биспецифического антитела.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению димеризованного полипептида согласно любому из вышеперечисленного для восстановления неправильных спариваний легкая цепь/тяжелая цепь во время получения мультиспецифического антитела.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению димеризованного полипептида согласно любому из вышеперечисленного для восстановления неправильных спариваний легкая цепь/тяжелая цепь антитела во время получения тетраспецифического антитела, триспецифического антитела и биспецифического антитела.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей димеризованный полипептид, антигенсвязывающую молекулу или антитело с модифицированным доменом согласно любому из вышеперечисленного.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к вектору экспрессии, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты согласно любому из вышеперечисленного.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты согласно любому из вышеперечисленного.

В некоторых вариантах осуществления предложена клетка-хозяин согласно любому из вышеперечисленного, которая получена путем трансформации (или трансдукции или трансфекции) вектором, описанным выше; причем указанная клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из прокариотических клеток и эукариотических клеток, предпочтительно эукариотических клеток и более предпочтительно клеток млекопитающих. Клетка-хозяин не включает какие-либо клетки животного или растения, способные развиваться в цельного индивидуума, такие как эмбриональные стволовые клетки человека, оплодотворенные яйцеклетки или зародышевые клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку и более предпочтительно клетку млекопитающего, включая, но не ограничиваясь, СНО (клетки яичника китайского хомячка), 293 (НЕК 293 - клетки почек эмбриона человека),

NSO (клетки несекретирующей миеломы мыши), и клетку, в которой может быть выполнено редактирование гена для изменения модификации гликозилирования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, тем самым изменяя функцию ADCC (антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, например, нокаутируя гены, такие как FUT8 (альфа-(1,6)-фукозилтрансфераза) или GnT-III (бета-1,4-маннозилгликопротеин-4-бета-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу получения димеризованного полипептида, антигенсвязывающей молекулы или антитела с модифицированным доменом согласно любому из вышеперечисленного, который включает стадии культивирования клетки-хозяина, описанной выше, и очистки и выделения димеризованного полипептида, антигенсвязывающей молекулы или антитела с модифицированным доменом.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к применению антигенсвязывающей молекулы, антитела с модифицированным доменом или фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного для получения лекарственного средства для лечения или предотвращения заболевания или состояния.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения или предотвращения заболевания или состояния, который включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антигенсвязывающей молекулы, антитела с модифицированным доменом или фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающей молекуле, антителу с модифицированным доменом или фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного для применения в качестве лекарственного средства; в некоторых вариантах осуществления указанное лекарственное средство предназначено для применения при лечении или предотвращении заболевания или состояния.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние согласно любому из вышеперечисленного представляет собой заболевание, связанное с костью, такое как заболевание или расстройство, представляющее собой остеопороз, остеопению или остеоартрит, ревматоидный артрит, пародонтит или множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления опухоль выбрана из группы, состоящей из карциномы, лимфомы, бластомы, саркомы, лейкоза и лимфоидных злокачественных новообразований. В некоторых вариантах осуществления опухоль выбрана из группы, состоящей из: плоскоклеточной карциномы, миеломы, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного

рака легкого (NSCLC), плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC), нейроглиомы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), фолликулярной лимфомы, острого лимфобластного лейкоза (ALL), острого миелоидного лейкоза (AML), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелоидного лейкоза (CML), первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы, мантийноклеточной лимфомы (MCL), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (SLL), В-крупноклеточной лимфомы, богатой Т-клетками/гистоцитами, множественной миеломы, белка миелоидного лейкоза-1 (Mcl-1), миелодиспластического синдрома (MDS), рака желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), рака почки, рака яичников, рака печени, лимфобластного лейкоза, лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака эндометрия, рака почки, рака предстательной железы, рака щитовидной железы, меланомы, хондросаркомы, нейробластомы, рака поджелудочной железы, мультиформной глиобластомы, рака желудка, рак кости, саркомы Юинга, рака шейки матки, рака головного мозга, рака желудка, рака мочевого пузыря, гепатомы, рака молочной железы, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы (HCC), светлоклеточного рака почки (RCC), рака головы и шеи, рака гортани, рака печени и желчевыводящих путей, рака центральной нервной системы, рака пищевода, злокачественной плевральной мезотелиомы, системного амилоидоза легкой цепи, лимфоплазмоцитарной лимфомы, миелодиспластического синдрома, миелопролиферативной опухоли, нейроэндокринной опухоли, карциномы Меркеля, рака яичек и рак кожи. В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из: ревматоидного артрита, псориаза, болезни Крона, анкилозирующего спондилита, рассеянного склероза, диабета I типа, гепатита (например, гепатита В, гепатита А, гепатита С), миокардита, синдрома Шегрена, аутоиммунной гемолитической анемии после отторжения трансплантата, буллезного пемфигоида, болезни Грейвса, тиреоидита Хашимото, системной красной волчанки (SLE), миастении гравис, пемфигуса и пернициальной анемии. В некоторых вариантах осуществления иммунное заболевание может быть выбрано из группы, состоящей из: ревматоидного артрита, псориаза, псориатического артрита, дерматита, системной склеродермии и склероза, воспалительного заболевания кишечника (IBD), болезни Крона, язвенного колита, респираторного дистресс-синдрома, менингита, энцефалита, увеита, гломерулонефрита, экземы, астмы, артериосклероза, дефицита адгезии лейкоцитов, рассеянного склероза, синдрома Рейно, синдрома Шегрена, ювенильного диабета, болезни Рейтера, болезни Бехчета, иммунокомплексного нефрита, IgA-нефропатии, IgM-полинейропатии, иммуноопосредованных тромбоцитопенических симптомов (таких как острая идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура и хроническая идиопатическая

тромбоцитопеническая пурпура), гемолитической анемии, миастении гравис, волчаночного нефрита, системной красной волчанки, ревматоидного артрита (РА), атопического дерматита, пемфигуса, болезни Грейвса, тиреоидита Хашимото, гранулематоза Вегенера, синдрома Оменна, хронической почечной недостаточности, острого инфекционного мононуклеоза, заболеваний, связанных с ВИЧ (вирус иммунодефицита человека) и вирусом герпеса, тяжелого острого респираторного синдрома, хореоретинита и иммунологических заболеваний, вызванных вирусной инфекцией (например, заболевания, вызванные или опосредованные инфекцией В-клеток вирусом Эпштейна-Барра (EBV)).

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1А и 1В показаны схематические изображения структуры границы раздела взаимодействия между цепью титин-Т и цепью обскурин-О или цепью обскурин-подобный-О с образованием димеризованного полипептидного комплекса, где на фиг. 1А показано схематическое изображение структуры границы раздела взаимодействия между цепью титин-Т и цепью обскурин-О; на фиг. 1В показано схематическое изображение структуры границы раздела взаимодействия между цепью титин-Т и цепью обскурин-подобный-О;

На фиг. 2 показано схематическое изображение Fab, в которой заменены CH1 и CL;

На фиг. 3 показано схематическое структурное изображение моноспецифического антитела IgG, в котором CH1 и CL с обеих сторон заменены;

На фиг. 4 показано схематическое структурное изображение биспецифического антитела IgG, в котором CH1 и CL с одной стороны заменены;

На фиг. 5 показано схематическое структурное изображение биспецифического антитела DI-1;

На фиг. 6А-6С показаны спектры масс-спектрометрии DI-1; где на фиг. 6А показаны спектры масс-спектрометрии LC1/LC2, и на фиг. 6В показаны спектры масс-спектрометрии HC1/HC2; на фиг. 6С показаны спектры масс-спектрометрии LC1 + LC2 + HC1 + HC2;

На фиг. 7 показаны схематические структурные изображения молекул перекрестно неправильно спаренных легкой/тяжелой цепи антитела;

На фиг. 8 показано схематическое структурное изображение биспецифического антитела BU5;

На фиг. 9А-9С показаны спектры масс-спектрометрии, где на фиг. 9А показан спектр масс-спектрометрии В0, на фиг. 9В показан спектр масс-спектрометрии U0, а на фиг. 9С показан спектр масс-спектрометрии BU5;

На фиг. 10 показаны результаты эксперимента по дифференцировке остеокластов биспецифического антитела DI-1;



На фиг. 11 показаны результаты эксперимента по пролиферации клеток TF1 биспецифического антитела DI-1;

На фиг. 12 показаны схематические структурные изображения биспецифических антител HJ-1, HJ-2, HJ-3 и HJ-4;

На фиг. 13A-13D показаны спектры масс-спектрометрии биспецифических антител HJ с совместной экспрессией четырех цепей, где на фиг. 13A показан спектр масс-спектрометрии HJ-1 с совместной экспрессией четырех цепей, на фиг. 13B показан спектр масс-спектрометрии HJ-2 с совместной экспрессией четырех цепей, на фиг. 13C показан спектр масс-спектрометрии HJ-3 с совместной экспрессией четырех цепей, а на фиг. 13D показан спектр масс-спектрометрии HJ-4 с совместной экспрессией четырех цепей;

На фиг. 14A-14B показаны спектры масс-спектрометрии биспецифического антитела HJ-1 с совместной экспрессией трех цепей HJ-1-H1, HJ-1-H2 и HJ-1-L2, где на фиг. 14A показан спектр масс-спектрометрии части деконволюции 120000-130000 (а.е.м.), а на фиг. 14B показан спектр масс-спектрометрии части деконволюции 140000-160000 (а.е.м.);

На фиг. 15A-15B показаны спектры масс-спектрометрии биспецифического антитела HJ-3 с совместной экспрессией трех цепей HJ-3-H1, HJ-3-H2 и HJ-3-L2; где на фиг. 15A показан спектр масс-спектрометрии части деконволюции 122600-125200 (а.е.м.), а на фиг. 15B показан спектр масс-спектрометрии части деконволюции 120000-148000 (а.е.м.);

На фиг. 16A-16B: на фиг. 16A показаны сайты взаимодействия между остатками цепи титин-Т/цепи обскурин-О, а на фиг. 16B показаны сайты взаимодействия между остатками цепи титин-Т/цепи обскурин-подобный-О;

На фиг. 17 показано схематическое изображение структуры биспецифического антитела в форме  $(\text{FabV})_2\text{-IgG}$ , сконструированной с использованием Fab с модифицированным доменом;

На фиг. 18 показаны экспериментальные результаты блокирования связывания PDL1 с PD-1 и связывания TIGIT с CD155 с использованием PDL1-TIGIT биспецифических антител;

На фиг. 19 показаны экспериментальные результаты стимуляции секреции IFN- $\gamma$  PDL1-TIGIT биспецифическими антителами; и

На фиг. 20 показаны экспериментальные результаты ингибирования ксенотрансплантатных опухолей у мышей MC38-HL1 с использованием PDL1-TIGIT биспецифических антител.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Для облегчения понимания настоящего изобретения ниже описаны некоторые

технические и научные термины. Если конкретно не определено иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют те же значения, которые обычно понимаются специалистом в данной области техники.

Как используется в описании и в формуле изобретения, формы единственного числа включают ссылки на формы множественного числа, если иное явно не указано в контексте.

Если иное четко не указано в контексте, во всем описании и формуле изобретения слова «содержать», «иметь», «включать» и тому подобное следует толковать во всеобъемлющем смысле, а не в исключительном или исчерпывающем смысле.

Термин «и/или» предназначен для включения двух значений, «и» и «или». Например, фраза «А, В и/или С» предназначена для охвата каждого из следующего: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно); и С (отдельно).

Трехбуквенные и однобуквенные коды для аминокислот, используемые в настоящем описании, раскрыты в *J. biol. chem.*, 243, p3558 (1968).

Термин «аминокислота» относится к встречающимся в природе и синтетическим аминокислотам, а также аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют аналогично встречающимся в природе аминокислотам. Встречающиеся в природе аминокислоты представляют собой аминокислоты, кодируемые генетическими кодами, и те аминокислоты, которые затем модифицируются, например, гидроксипролин,  $\gamma$ -карбоксиглутаминовая кислота и О-фосфосерин. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, которые имеют по существу идентичную химическую структуру (т.е.  $\alpha$ -углерод, который связывается с водородом, карбоксильной, амино и R-группой) с встречающимися в природе аминокислотами, например, гомосерин, норлейцин, сульфоксид метионина и метионинметилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированную R-группу (например, норлейцин) или модифицированный пептидный скелет, но сохраняют по существу идентичную химическую структуру с встречающимися в природе аминокислотами. Миметики аминокислот относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, отличную от аминокислот, но функционируют аналогично встречающимся в природе аминокислотам.

Термин «аминокислотная мутация» включает аминокислотные замены (также известные как замены аминокислот), делеции, вставки и модификации. Для получения конечной конструкции может быть выполнена любая комбинация замен, делеций, вставок и модификаций, до тех пор, пока конечная конструкция обладает желаемыми свойствами, такими как сниженное связывание с Fc-рецептором. Делеции и вставки в аминокислотной последовательности включают делеции и вставки на аминоконце и/или карбоксиконце полипептидной цепи. Конкретные аминокислотные мутации могут представлять собой

аминокислотные замены. В одном варианте осуществления аминокислотная мутация представляет собой неконсервативную аминокислотную замену, т.е. замену одной аминокислоты другой аминокислотой, имеющей другие структурные и/или химические свойства. Аминокислотные замены включают замену на не встречающиеся в природе аминокислоты или аминокислотные производные 20 нативных аминокислот (например, 4-гидроксипролин, 3-метилгистидин, орнитин, гомосерин и 5-гидроксилизин). Аминокислотные мутации могут быть получены с использованием генетических или химических способов, хорошо известных в данной области техники. Генетические способы могут включать сайт-направленный мутагенез, ПЦР, синтез генов и тому подобное. Предполагается, что также могут быть использованы способы изменения групп боковых цепей аминокислот, отличные от геной инженерии, такие как химическая модификация. В настоящем документе могут быть использованы различные названия для обозначения одной и той же аминокислотной мутации. В настоящем документе выражение «положение + аминокислотный остаток» может быть использовано для обозначения аминокислотного остатка в определенном положении. Например, 366W указывает на то, что аминокислотный остаток в положении 366 представляет собой W. T366W указывает на то, что аминокислотный остаток в положении 366 мутирован из исходного T в W.

Термин «антитело» используется в самом широком смысле и охватывает различные структуры антител, включая, но не ограничиваясь, моноклональные антитела, поликлональные антитела; моноспецифические антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и полноразмерные антитела и фрагменты антител (или антигенсвязывающие фрагменты, или антигенсвязывающие части), при условии, что они проявляют желаемую антигенсвязывающую активность. «Природное антитело» относится встречающейся в природе молекуле иммуноглобулина. Например, природное антитело IgG представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин около 150000 Дальтон, состоящий из двух идентичных легких цепей и двух идентичных тяжелых цепей, связанных дисульфидной связью. От N-конца к C-концу каждая тяжелая цепь имеет одну переменную область (VH), также известную как переменный домен тяжелой цепи или переменная область тяжелой цепи, за которой следует одна константная область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи обычно состоит из трех константных доменов (CH1, CH2 и CH3). Аналогичным образом, от N-конца к C-концу каждая легкая цепь имеет одну переменную область (VL), также известную как переменный легкий домен или переменный домен легкой цепи, за которой следует один константный легкий домен (константная область легкой цепи, CL). Термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» и «целое антитело» в настоящем документе являются взаимозаменяемыми и

относятся к антителу, имеющему структуру, которая по существу аналогична структуре нативного антитела, или имеющему тяжелые цепи в области Fc, как описано в настоящем документе. В природном интактном антителе легкая цепь содержит переменную область легкой цепи VL и константную область CL, где VL расположена на аминоконце легкой цепи, а константная область легкой цепи содержит  $\kappa$ -цепь и  $\lambda$ -цепь; тяжелая цепь содержит переменную область VH и константную область (CH1, CH2 и CH3), где VH расположена на аминоконце тяжелой цепи, а константная область расположена на карбоксильном конце, где CH3 находится ближе всего к карбоксильному концу полипептида, и тяжелая цепь может быть любого изотипа, включая IgG (включая подтипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgA (включая подтипы IgA1 и IgA2), IgM и IgE.

Термин «переменная область» или «переменный домен» антитела относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, участвующему в связывании антитела с антигеном. Здесь каждая переменная область тяжелой цепи (VH) и переменная область легкой цепи (VL) антитела содержит четыре консервативные каркасные области (FR) и три определяющие комплементарность области (CDR). Термин «определяющая комплементарность область» или «CDR» относится к области в переменном домене, которая в первую очередь способствует связыванию антигена; «каркас» или «FR» относится к остаткам переменного домена, отличным от остатков CDR. VH содержит 3 области CDR: HCDR1, HCDR2 и HCDR3; VL содержит 3 области CDR: LCDR1, LCDR2 и LCDR3. Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца (также известного как N-конец) до карбоксильного конца (также известного как C-конец) в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

Границы аминокислотных последовательностей CDR могут быть определены с использованием любой из множества хорошо известных схем, включая схему нумерации «Кабат» (см. Kabat et al. (1991), «Sequences of Proteins of Immunological Interest», 5<sup>th</sup> ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD), схему нумерации «Чотиа», схему нумерации «ABM», схему нумерации «contact» (см. Martin, ACR. Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains[J]. 2001) и схему нумерации ImMunoGenTics (IMGT) (см. Lefranc, M. P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003); Front Immunol. 2018 Oct 16; 9: 2278) и тому подобное. Соответствующие взаимосвязи между различными схемами нумерации хорошо известны специалистам в данной области техники и являются иллюстративными, как показано в таблице 1 ниже.

Таблица 1. Взаимосвязи между схемами нумерации CDR

CDR	IMGT	Кабат	AbM	Чотиа	Contact
-----	------	-------	-----	-------	---------

HCDR1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
HCDR2	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
HCDR3	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
LCDR1	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
LCDR2	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
LCDR3	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

Если не указано иное, схема нумерации «Кабат» применяется к последовательностям переменных областей и CDR в настоящем документе.

Термин «фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит фрагмент интактного антитела, который связывается с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, однодоменные антитела, одноцепочечные Fab (scFab), диатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител (например, scFv) и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой одновалентный Fab (т.е. Fab), двухвалентный Fab (F(ab)<sub>2</sub>), трехвалентный фрагмент Fab (F(ab)<sub>3</sub>), мультивалентный Fab (два или более Fab) или может представлять собой моноспецифический или мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, содержащий по меньшей мере один фрагмент Fab.

Термин «антигенсвязывающая молекула» относится к белку, который способен специфически связываться с антигеном.

Термин «область Fc» или «область кристаллизуемого фрагмента» используется для определения C-концевой области тяжелой цепи антитела, включая нативные области Fc и модифицированные области Fc. В некоторых вариантах осуществления область Fc содержит две субъединицы, которые могут быть идентичными или различными. В некоторых вариантах осуществления область Fc тяжелой цепи IgG человека определяется как проходящая от аминокислотного остатка в положении Cys226 или от Pro230 до его карбоксильного конца. Подходящие области Fc, используемые для антител, описанных в настоящем документе, включают области Fc IgG1, IgG2 (IgG2A и IgG2B), IgG3 и IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления границы области Fc также могут быть изменены, например, путем делеции C-концевого лизина области Fc (остатка 447 в соответствии со схемой нумерации EU) или делеции C-концевого глицина и лизина области Fc (остатки 446 и 447 в соответствии со схемой нумерации EU). Если не указано иное, схема нумерации для области Fc представляет собой схему нумерации EU, также известную как

индекс EU.

Термин «антитело с модифицированным доменом», описанный в настоящем документе, относится к антителу, в котором CH1 и/или CL заменены другими доменами или пептидными фрагментами, например, CH1/CL заменен цепью титин-Т/ цепью обскурин-О или цепью титин-Т/цепью обскурин-подобный-О. В некоторых вариантах осуществления антитело с модифицированным доменом представляет собой моноспецифическое антитело или мультиспецифическое антитело; в некоторых вариантах осуществления антитело с модифицированным доменом представляет собой одновалентное антитело, двухвалентное антитело или мультивалентное антитело; в некоторых вариантах осуществления антитело с модифицированным доменом представляет собой интактное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; в некоторых вариантах осуществления схематическое структурное изображение Fab с модифицированным доменом, в котором CH1/CL Fab заменен цепью титин-Т/цепью обскурин-О или цепью титин-Т/цепью обскурин-подобный-О, показано на фиг. 2; схематическое структурное изображение антитела с модифицированным доменом, в котором CH1/CL моноклонального антитела заменен цепью титин-Т/цепью обскурин-О или цепью титин-Т/цепью обскурин-подобный-О, показано на фиг. 3; схематическое структурное изображение антитела с модифицированным доменом, в котором CH1/CL с одной стороны биспецифического антитела заменен цепью титин-Т/цепью обскурин-О или цепью титин-Т/цепью обскурин-подобный-О, показано на фиг. 4. Другие антитела с модифицированным доменом, в которых по меньшей мере одна CH1 и по меньшей мере одна CL заменены цепью титин-Т/цепью обскурин-О или цепью титин-Т/цепью обскурин-подобный-О, включают, но не ограничиваются, двухвалентное антитело, в котором CH1 и CL с одной стороны заменены цепью титин-Т/цепью обскурин-О или цепью титин-Т/цепью обскурин-подобный-О, биспецифическое антитело, в котором CH1 и CL с обеих сторон заменены цепью титин-Т/цепью обскурин-О или цепью титин-Т/цепью обскурин-подобный-О, фрагмент F(ab)<sub>2</sub>, в котором 2 CH1/CL заменены цепью титин-Т/цепью обскурин-О или цепью титин-Т/цепью обскурин-подобный-О, или фрагмент F(ab)<sub>3</sub>, в котором 1, или 2, или 3 CH1/CL заменены цепью титин-Т/цепью обскурин-О или цепью титин-Т/цепью обскурин-подобный-О.

«Титин» представляет собой большой саркомерный белок со сложной молекулярной структурой укладки. Известно, что он выполняет функции связывания толстых миофиламентов с Z-линией, поддерживая целостность и стабильность миофибрилл и т. п. Титин является третьим по распространенности белком в волокнах скелетных мышц, с молекулярной массой 2700 кДа (более 25000 аминокислот) и длиной 1 мкм, что составляет около половины саркомеры.

«Ig-подобный домен титина 152» представляет собой Ig-подобный домен на белке титин, называемый Ig-подобным доменом титина 152, который способен связываться с Ig-подобным доменом обскурина 1 или обскурин-подобным Ig-подобным доменом 1 с образованием комплекса (доступно из базы данных RCSB PDB).

«Цепь титин-Т» или «цепь Т» относится к пептидному фрагменту длиной 78-118 аминокислот, содержащему Ig-подобный домен титина 152 в белке титин, или ее функциональному варианту, где цепь титин-Т способна связываться с Ig-подобным доменом обскурина 1 или обскурин-подобным Ig-подобным доменом 1 с образованием димеризованного комплекса. Функциональный вариант цепи Т получают путем мутации на части аминокислот цепи Т дикого типа, но он все еще содержит пептид, который связывается с Ig-подобным доменом обскурина 1 или обскурин-подобным Ig-подобным доменом 1 с образованием димеризованного комплекса. В настоящем изобретении цепь титин-Т может быть использована для замены домена СН1 или СL антитела, не влияя на связывание антитела с антигеном. Часть аминокислот Ig-подобного домена титина 152 может быть мутирована, сохраняя при этом свою функцию связывания с Ig-подобным доменом обскурина 1 или обскурин-подобным Ig-подобным доменом 1 с образованием комплекса. Например, аминокислоты подходящей длины добавляют или отсекают на С-конце и/или N-конце Ig-подобного домена титина 152; могут быть добавлены или усечены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных остатков; например, 5 аминокислот «KAGIR» в 5 белках титин дикого типа, которые непосредственно примыкают к N-концу Ig-подобного домена титина 152, добавляют к N-концу Ig-подобного домена титина 152, который все еще имеет функцию связывания с Ig-подобным доменом обскурина 1 или обскурин-подобным Ig-подобным доменом 1 с образованием комплекса. Другие мутации также могут быть совершены на аминокислотах Ig-подобного домена титина 152, например, некоторые аминокислоты могут быть мутированы для увеличения межцепочечных дисульфидных связей, улучшения стабильности комплекса, и т. д. В некоторых вариантах осуществления цепь титин-Т представляет собой полипептид, содержащий аминокислотные остатки в положениях 7-60 SEQ ID NO: 32 или ее мутированной последовательности. В некоторых вариантах осуществления цепь титин-Т представляет собой полипептид, содержащий аминокислотные остатки в положениях 1-96 SEQ ID NO: 32 или ее мутированной последовательности. В некоторых вариантах осуществления цепь титин-Т представляет собой вариант SEQ ID NO: 32, содержащий замены аминокислотных остатков в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 60 и 64, например, содержащий одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 60S и 64T. В некоторых вариантах осуществления цепь титин-Т представляет

собой вариант SEQ ID NO: 32, содержащий замены аминокислотных остатков в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 60 и 64, и дополнительно содержащий замены аминокислотных остатков в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 3, 8, 11, 13, 20, 22, 25, 26, 39, 40, 42, 45, 47, 49, 56, 58, 66, 70, 75, 77, 79, 81, 82, 83 и 84; например, вариант дополнительно содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 3W, 8C, 11I, 13L, 20C, 22M/22C, 25S, 26C, 39T, 40S, 42K, 45S, 47E, 49G, 56S, 58E, 66S/66K, 70R, 75V, 77S, 79T, 81R, 82M, 83D и 84L. В некоторых вариантах осуществления цепь титин-Т представляет собой полипептид, содержащий аминокислотные остатки в положениях 7-60 SEQ ID NO: 32 или ее мутированной последовательности. В некоторых вариантах осуществления цепь титин-Т представляет собой полипептид, содержащий аминокислотные остатки в положениях 1-96 SEQ ID NO: 32 или ее мутированной последовательности.

«Обскурин» представляет собой белок, кодируемый геном OBSCN и принадлежащий к семейству гигантских саркозидных сигнальных белков. Обскурин экспрессируется в сердечной и скелетных мышцах и играет важную роль в организации миофибрилл при сборке саркомеры. Обскурин является основным цитоплазматическим лигандом саркоплазматического ретикулина sANK1 (малый анкирин 1), который может предотвратить деградацию sANK1 (Lange S et al., *Molecular Biology of the Cell.*, 23 (13): 2490–504); Обскурин действует как сигнальная связь между доменом саркоплазматического ретикулума и доменом саркоплазматического ретикулума (Bagnato P et al., *The Journal of Cell Biology.*, 160 (2): 245–53); Обскурин участвует в формировании новых саркомер при сборке миофибрилл (Borisov AB, et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, 310 (3): 910–918).

«Ig-подобный домен обскурина 1» представляет собой Ig-подобный домен в белке обскурин, называемый Ig-подобным доменом обскурина 1, который способен связываться с Ig-подобным доменом титина 152 с образованием димеризованного комплекса (доступно из базы данных RCSB PDB).

«Цепь обскурина-О» или «цепь О» относится к пептидному фрагменту длиной 87-117 аминокислот, содержащему Ig-подобный домен обскурина 1 в белке обскурин, или ее функциональный вариант, который способен связываться с Ig-подобным доменом титина 152 с образованием димеризованного комплекса. Функциональный вариант цепи обскурина-О получен путем мутации на части аминокислот цепи О дикого типа, но все еще содержит пептид, который связывается с Ig-подобным доменом титина 152 с образованием димеризованного комплекса. В настоящем изобретении цепь обскурина-О может заменять



домен СН1 или СL антитела, не влияя на связывание антитела с антигеном. Часть аминокислот Ig-подобного домена обскурина 1 может быть мутирована, сохраняя при этом свою функцию связывания с Ig-подобным доменом титина 152 с образованием комплекса. Например, аминокислоты подходящей длины добавляют или усекают на С-конце и/или N-конце домена обскурина-О, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот добавляют или усекают; например, 5 аминокислот «DQPQF» в 5 белках обскурин дикого типа, которые непосредственно примыкают к N-концу Ig-подобного домена обскурина 1, добавляют к N-концу домена обскурина-О, который все еще имеет функцию связывания с Ig-подобным доменом титина 152 с образованием димеризованного комплекса. Другие мутации также могут быть сделаны на части аминокислот Ig-подобного домена обскурина 1, например, некоторые аминокислоты могут быть мутированы для увеличения межцепочечных дисульфидных связей, улучшения стабильности антитела, и т. п. В некоторых вариантах осуществления цепь обскурин-О представляет собой вариант SEQ ID NO: 33, содержащий замены аминокислотных остатков в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 13, 32, 48, 66, 82 и 93, например, содержащий одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 13S, 32F, 48V, 66C, 82H и 93C; в некоторых вариантах осуществления цепь обскурин-О представляет собой вариант SEQ ID NO: 33, дополнительно содержащий замены аминокислотных остатков в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 2, 3, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 17, 20, 22, 25, 30, 32, 34, 36, 41, 42, 44, 45, 53, 58, 62, 67, 69, 76, 88, 89, 92, 94 и 97, например, дополнительно содержащий одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 2E, 3C, 7K/7R, 9C, 11L, 12S, 13Y, 14T, 17E, 20L, 22M/22S, 25S, 30D, 32P, 34E, 36T, 41K, 42L, 44I, 45T, 53L, 58V, 62E/62K/62H, 67Q/67T, 69S, 76S, 88C, 89L, 92E, 94G и 97G. В некоторых вариантах осуществления цепь обскурин-О представляет собой полипептид, содержащий аминокислотные остатки в положениях 3-90 SEQ ID NO: 33 или ее мутированной последовательности.

«Обскурин-подобный 1» представляет собой белок, кодируемый геном OBSL1, расположенным в SPEG хромосомы 2q35 человека, и тесно связан с обскурином. Альтернативный сплайсинг «обскурин-подобного 1» приводит к образованию нескольких изоформ с прогнозируемой молекулярной массой в диапазоне от 130 до 230 кДа (Geisler SB et al., (2007), *Genomics*, 89 (4): 521-531).

«Ig-подобный домен обскурин-подобного 1» представляет собой Ig-подобный домен в обскурин-подобном белке 1, называемый Ig-подобным доменом обскурин-подобного 1, который способен связываться с Ig-подобным доменом титина 152 с образованием комплекса (доступно из базы данных RCSB PDB).

«Цепь обскурин-подобный-О» или «цепь OL» относится к пептидному фрагменту длиной 78-118 аминокислот, содержащему Ig-подобный домен обскурин-подобного 1 в обскурин-подобном белке 1, или ее функциональному варианту. Цепь обскурин-подобный-О способна связываться с Ig-подобным доменом титина 152 с образованием димеризованного комплекса. Функциональный вариант цепи обскурин-подобный-О получен путем мутации на части аминокислот цепи OL дикого типа, но все еще имеет пептид, который связывается с Ig-подобным доменом титина 152 с образованием димеризованного комплекса. В настоящем изобретении цепь обскурин-подобный-О может заменять домен CH1 или CL антитела, не влияя на образование антигенсвязывающего сайта VH и VL антитела и связывание антитела с антигеном. Часть аминокислот Ig-подобного домена обскурин-подобного 1 может быть мутирована, сохраняя при этом свою функцию связывания с Ig-подобным доменом титина 152 с образованием димеризованного комплекса. Например, аминокислоты подходящей длины добавляли или усекали на С-конце и/или N-конце домена обскурина-О, например, добавляли или усекали 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот. Другие мутации также могут быть сделаны на части аминокислот Ig-подобного домена обскурин-подобного 1, например, некоторые аминокислоты могут быть мутированы для увеличения межцепочечных дисульфидных связей, улучшения стабильности антитела, и т. п. В некоторых вариантах осуществления цепь обскурин-подобный-О представляет собой вариант SEQ ID NO: 34, содержащий замены аминокислотных остатков в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 6, 26, 74, 77, 84 и 86, например, содержащий одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 6E, 26S, 74C, 77S, 84C и 86C. В некоторых вариантах осуществления цепь обскурин-подобный-О представляет собой полипептид, содержащий аминокислотные остатки в положениях 4-91 SEQ ID NO: 34 или ее мутированной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления часть аминокислот в Ig-подобном домене титина 152, Ig-подобном домене обскурина 1 и/или Ig-подобном домене обскурин-подобного 1 являются мутированными, которые все еще обладают способностью связывать Ig-подобный домен титина 152 с Ig-подобным доменом обскурина 1 с образованием комплекса или обладают способностью связывать Ig-подобный домен титина 152 с доменом обскурин-подобного 1 с образованием комплекса. В некоторых вариантах осуществления раскрыты цепь титин-Т/цепь обскурин-О димеризованный полипептид и цепь титин-Т/цепь обскурин-подобный-О димеризованный полипептид, где один или более остатков в положениях 7-15, 19-24, 26, 55, 59 и 60 в цепи титин-Т связаны с одним или более остатков в положениях 3-6, 9, 41, 73, 75 и 80-90 в цепи обскурин-О, и один или более остатков в

положениях 1, 7-10, 13-16, 19-26, 59-60 и 96 в цепи титин-Т связаны с одним или более остатков в положениях 4-5, 10, 12-13, 74, 76, 78 и 82-91 в цепи обскурин-подобный-О; положения остатков в цепи титин-Т представляют собой положения согласно нумерации естественной последовательности относительно последовательности SEQ ID NO: 32; положения остатков в цепи обскурин-О представляют собой положения согласно нумерации естественной последовательности относительно последовательности SEQ ID NO: 33; положения остатков в цепи обскурин-подобный-О представляют собой положения нумерации согласно естественной последовательности относительно последовательности SEQ ID NO: 34.

«Fab» относится к белку, состоящему из VH и CH1 (тяжелая цепь Fab) и VL и CL (легкая цепь Fab) иммуноглобулина.

«Fab с модифицированным доменом» или «FabV» относится к полипептидному фрагменту Fab, в котором CL и/или CH1 заменены другими доменами или пептидными фрагментами. В Fab с модифицированным доменом VH и VL все еще могут взаимодействовать с образованием антигенсвязывающего сайта и сохранять способность связываться с антигеном. В некоторых вариантах осуществления Fab с модифицированным доменом может быть частью мультивалентного антитела (например, двухвалентного антитела или трехвалентного антитела). В некоторых других вариантах осуществления фрагмент Fab с модифицированным доменом представляет собой одну антигенсвязывающую молекулу. В некоторых вариантах осуществления CH1/CL Fab заменен цепью титин-Т/цепью обскурин-О или цепью титин-Т/цепью обскурин-подобный-О, и схематическое структурное изображение Fab с модифицированным доменом показано на фиг. 2.

Термин «специфическое антитело» или «специфически связанное антитело» относится к антителу, способному специфически связываться с целевым антигеном или эпитопом. Антитела классифицируются на моноспецифические антитела, биспецифические антитела, триспецифические антитела, тетраспецифические антитела, ..., мультиспецифические (связывающиеся с двумя или более различными целевыми антигенами или различными эпитопами одного и того же антигена) антитела в соответствии с количеством различных целевых антигенов или различных эпитопов, с которыми связываются антитела. Например, «биспецифическое антитело» относится к антителу, которое способно специфически связываться с двумя различными антигенами или двумя различными эпитопами одного и того же антигена. В предшествующем уровне техники раскрыты биспецифические антитела различной структуры; биспецифические антитела могут быть классифицированы на IgG-подобные биспецифические антитела и

биспецифические антитела типа антитело-фрагмент в соответствии с целостностью молекул IgG; биспецифические антитела могут быть классифицированы на двухвалентные, трехвалентные, четырехвалентные, ... , мультиспецифические (двухвалентные или выше) антитела в соответствии с количеством антигенсвязывающих областей; биспецифические антитела могут быть классифицированы на симметричные биспецифические антитела и асимметричные биспецифические антитела в зависимости от того, являются ли их структуры симметричными или асимметричными. Среди них биспецифические антитела на основе фрагментов антител, таких как фрагменты Fab, не содержащие фрагменты Fc, образованные путем связывания 2 или более фрагментов Fab в одной молекуле, имеют низкую иммуногенность, малую молекулярную массу и высокую проникаемость в опухолевую ткань, и типичные структуры антител этого типа включают биспецифические антитела, такие как F(ab)<sub>2</sub>, scFv-Fab и (scFv)<sub>2</sub>-Fab; IgG-подобные биспецифические антитела (например, антитела, имеющие фрагменты Fc) имеют относительно большую молекулярную массу, и фрагменты Fc облегчают последующую очистку антитела и повышают их растворимость и стабильность, и фрагменты Fc могут дополнительно связываться с рецептором FcRn и увеличивать период полувыведения антитела в сыворотке, и типичные структурные модели биспецифических антител включают биспецифические антитела, такие как KiH, CrossMAb, квадрама Triomab, FcΔAdp, ART-Ig, BiMAb, Biclonics, BEAT, DuoBody, Azymetric, XmAb, 2:1 TCB, 1Fab-IgG TDB, FynomAb, два-в-одном/DAF, scFv-Fab-IgG, DART-Fc, LP-DART, CODV-Fab-TL, HLE-BiTE, F(ab)<sub>2</sub>-CrossMAb, IgG-(scFv)<sub>2</sub>, Bs4Ab, DVD-Ig, четырехвалентный-DART-Fc, (scFv)<sub>4</sub>-Fc, CODV-Ig, mAb2 и F(ab)<sub>4</sub>-CrossMAb (см. Aran F. Labrijn et al., Nature Reviews Drug Discovery, volume 18, pages 585-608 (2019); Chen S1 et al., J Immunol Res., Feb. 11, 2019: 4516041).

Термины «одновалентное», «двухвалентное», «трехвалентное» или «мультивалентное» антитело относятся к антителу, в котором в антителе присутствует определенное количество антигенсвязывающих сайтов. Например, «одновалентное антитело» указывает на наличие одного антигенсвязывающего сайта в антителе, «двухвалентное антитело» указывает на наличие двух антигенсвязывающих сайтов в антителе, «трехвалентное антитело» указывает на наличие трех антигенсвязывающих сайтов в антителе, а «мультивалентное антитело» указывает на наличие нескольких (например, 2 или более) антигенсвязывающих сайтов в антителе.

Термины «полипептид» и «белок» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и обозначают полимер аминокислотных остатков. Термины относятся к аминокислотным полимерам, в которых один или более аминокислотных остатков представляют собой искусственные химические мимики соответствующих встречающихся

в природе аминокислот, а также к встречающимся в природе аминокислотным полимерам и не встречающимся в природе аминокислотным полимерам. Если не указано иное, конкретная полипептидная последовательность также неявно охватывает консервативно модифицированные варианты.

Термин «антигенсвязывающий домен» относится к области в антигенсвязывающей молекуле (например, антителе), которая специфически связывается с антигеном, который может представлять собой фрагмент лиганд-связывающего домена, который способен непосредственно связываться с антигеном, или к домену, который содержит переменную область антитела, которая способна непосредственно связываться с антигеном. Термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к фрагменту антигенсвязывающей молекулы (например, антитела), который содержит антигенсвязывающий домен.

Термин «слияние» или «связь» означает, что компоненты (например, два полипептида) связаны непосредственно или посредством ковалентной связи через один или более линкеров. Когда линкер представляет собой пептидный линкер, ковалентная связь представляет собой пептидную связь.

Термин «домен взаимодействия» относится к домену полипептида, который способен облегчать взаимодействие или связывание двух или более гомологичных или гетерологичных полипептидов. Например, домены взаимодействия представляют собой домены димеризации, которые облегчают связывание друг с другом с образованием димера. Домен межбелкового взаимодействия представляет собой домен полипептида, который облегчает взаимодействие или связывание между двумя или более белками, например, Ig-подобным доменом обскурин-подобного 1 в обскурин-подобном белке, который способен образовывать комплекс с Ig-подобным доменом титина 152 в белке титин посредством взаимодействий. В некоторых вариантах осуществления домен, который взаимодействует с цепью титин-Т, представляет собой цепь обскурин-О или цепь обскурин-подобный-О.

Термин «димеризованный полипептид» относится к димерному полипептиду (также называемому димеризованным комплексом), образованному путем связывания двух полипептидов посредством ковалентных или нековалентных взаимодействий. Гомодимер представляет собой димер, образованный из двух идентичных полипептидов, а гетеродимер представляет собой димер, образованный из двух разных полипептидов. Полипептиды могут быть соединены или связаны любыми подходящими средствами, например, посредством линкера, дисульфидной связи, водородной связи, электростатического взаимодействия, солевого мостика, гидрофобно-гидрофильного взаимодействия или их комбинации. В качестве примера, две молекулы полипептида могут образовывать димер через природные межцепочечные связи, а также могут образовывать димер через

неприродные межцепочечные связи. В некоторых вариантах осуществления димеризованные полипептиды на основе цепи титин-Т и цепи обскурин-О или димеризованные полипептиды на основе цепи титин-Т и цепи обскурин-подобный-О могут образовывать димер через природные межцепочечные связи. Кроме того, специалистам в данной области техники хорошо известно, что для двух доменов, связанных друг с другом с образованием димера, остатки контактной границы раздела первого домена и второго домена, которые разделены на расстоянии в пределах 6 ангстрем (в частности, в пределах 4,5 ангстрем), играют решающую роль в поддержании связывания этих двух доменов (Yan, Changhui et al., «Characterization of protein-protein interfaces», The protein journal, vol., 27, 1 (2008): 59-70). В настоящем изобретении посредством анализа димеризованных комплексов, образованных путем связывания цепи титин-Т с цепью обскурин-О и связывания цепи титин-Т с цепью обскурин-подобный-О, с помощью системы МОЕ (молекулярной операционной среды) (см. фиг. 1А и фиг. 1В) обнаружено, что один или более остатков в положениях 7-15, 19-24, 26, 55, 59 и 60 в цепи титин-Т и один или более остатков в положениях 3-6, 9, 41, 73, 75 и 80-90 в цепи обскурин-О взаимодействуют друг с другом, и один или более остатков в положениях 1, 7-10, 13-16, 19-26, 59-60 и 96 в цепи титин-Т и один или более остатков в положениях 4-5, 10, 12-13, 74, 76, 78 и 82-91 в цепи обскурин-подобный-О взаимодействуют друг с другом (см. фиг. 16А и фиг. 16В для сайтов связывания), где остатки контактной границы раздела в перечисленных выше положениях вышеуказанных димеризованных комплексов разделены на расстоянии в пределах 4,5 ангстрем, что играет решающую роль в поддержании связывания этих двух доменов. В настоящем изобретении, в некоторых вариантах осуществления цепь титин-Т и цепь обскурин-О или цепь титин-Т и цепь обскурин-подобный-О образуют димер посредством неприродных межцепочечных связей, где димер содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более неприродных межцепочечных связей. Дисульфидную связь между цепью титин-Т и цепью обскурин-О или между цепью титин-Т и цепью обскурин-подобный-О можно сделать более стабильной путем мутации некоторых аминокислот в цепи титин-Т, цепи обскурин-О или цепи обскурин-подобный-О, тем самым способствуя образованию стабилизированного димера между ними. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения две межцепочечные связи становятся более стабильными посредством мутации одного или более аминокислотных остатков в положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 8, 20, 22, 25, 26 и 39, в цепи титин-Т и/или в положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 3, 9, 25, 66, 76, 88 и 93, в цепи обскурин-О; или две межцепочечные связи становятся более стабильными посредством мутации одного или более аминокислотных остатков в положениях, выбранных из группы, состоящей из положений

8, 20, 22, 25, 26 и 39, в цепи титин-Т и/или в положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 6, 26, 74, 77, 84 и 86, в цепи обскурин-подобный-О.

В настоящем описании «неправильное спаривание» означает, что два или более гомологичных или гетерологичных полипептида взаимодействуют или связаны с образованием нежелательного димера или мультимера спаривания. «Неправильное спаривание менее предрасположено к возникновению» означает, что, например, когда полипептиды A1, B1 и B2 совместно экспрессируются, желательнее, чтобы продуцировался димер A1-B1, и нежелательнее, чтобы продуцировался димер A1-B2, и, если количество экспрессии димера A1-B1, в конечном счете, больше, чем у димера A1-B2, считается, что A1 и B1 преимущественно спариваются, то есть неправильное спаривание менее предрасположено к возникновению между A1 и B2. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в биспецифических антителах, содержащих димеризованные полипептиды на основе цепи титин-Т и цепи обскурин-О или димеризованные полипептиды на основе цепи титин-Т и цепи обскурин-подобный-О по настоящему изобретению, неправильное спаривание менее предрасположено к возникновению между VH1 и VL2 и/или между VL1 и VH2; преимущественное спаривание происходит между VH1 и VL1, а также между VH2 и VL2.

«Дисульфидная связь» относится к ковалентной связи, образованной между атомами серы в структуре R-S-S-R'. Аминокислотный цистеин содержит тиольную группу, которая может образовывать дисульфидную связь со второй тиольной группой, например, с тиольной группой другого остатка цистеина. Дисульфидные связи могут быть образованы между тиольными группами двух остатков цистеина, расположенных на двух полипептидных цепях, соответственно, образуя тем самым межцепочечный мостик или межцепочечную связь.

Электростатическое взаимодействие представляет собой нековалентное взаимодействие, играет решающую роль в укладке, стабильности, гибкости и функционировании белка и включает ионное взаимодействие, водородную связь и галогенную связь. Электростатическое взаимодействие может быть образовано в полипептидах, например, между Lys и Asp, между Lys и Glu, между Glu и Arg или между Glu или Trp на первой цепи и Arg, Val или Thr на второй цепи.

Солевой мостик представляет собой электростатическое взаимодействие на близком расстоянии, которое происходит в основном из анионного карбоксилата Asp или Glu и из катионного аммония Lys или гуанидильной группы Arg, и представляет собой пару противоположно заряженных остатков в непосредственной пространственной близости в структуре нативного белка. Заряженные и полярные остатки при гидрофобной границе

раздела могут действовать как «горячие точки» для связывания. Остатки, имеющие ионизируемые боковые цепи, такие как His, Tyr и Ser, также могут участвовать в образовании солевых мостиков.

Гидрофильное взаимодействие означает, что молекулы с полярными группами обладают высокой аффинностью к воде и могут образовывать промежуточные связи с водой через водородные связи. Гидрофобное взаимодействие представляет собой нековалентное взаимодействие между неполярными молекулами. Эти неполярные молекулы (например, некоторые нейтральные аминокислотные остатки, также известные как гидрофобные остатки) имеют тенденцию агрегировать друг с другом в водной среде и держаться подальше от воды. Например, гидрофобные взаимодействия могут быть образованы между одним или более из Val, Tyr и Ala в первой цепи и одним или более из Val, Leu и Trp во второй цепи, или His и Ala в первой цепи и Thr и Phe во второй цепи. (См. Brinkmann et al., 2017).

Термин «водородная связь» означает образование электростатического притяжения между двумя полярными группами, когда атом водорода ковалентно связан с высокоэлектронегативным атомом, таким как азот, кислород или фтор. Водородные связи могут быть образованы между каркасными атомами кислорода (например, халькогенными группами) и амидными атомами водорода (азотными группами) двух остатков полипептида, например, водородная связь может быть образована между азотной группой в Asn и кислородной группой в His, или кислородной группой в Asn и азотной группой в Lys. Взаимодействия между водородными связями сильнее, чем взаимодействия Ван-дер-Ваальса, но слабее, чем взаимодействия между ковалентными или ионными связями, и имеют решающее значение для поддержания вторичных и третичных структур. Например,  $\alpha$ -спираль образуется, когда расстояние между аминокислотными остатками является регулярным между положениями  $i$  и  $i+4$ , и лист скрученных складок, образованных пептидными фрагментами длиной 3-10 аминокислот, когда два пептида связаны через по меньшей мере две или три каркасные водородные связи, представляет собой  $\beta$ -лист.

«Неприродные межцепочечные связи» относятся к межцепочечным связям, не встречающимся в полипептидных полимерах дикого типа. Например, неприродная межцепочечная связь может быть образована между мутированным аминокислотным остатком одного полипептида и аминокислотным остатком дикого типа или мутированным аминокислотным остатком другого полипептида. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна неприродная межцепочечная связь представляет собой «дисульфидную связь», образованную после аминокислотной мутации.

Термин «контактная граница раздела» относится к конкретной области на



полипептидах, где полипептиды находятся в контакте или взаимодействуют друг с другом. Контактная граница раздела содержит один или более аминокислотных остатков, и при взаимодействии аминокислотные остатки контактной границы раздела на полипептиде способны взаимодействовать с соответствующими аминокислотными остатками, с которыми они находятся в контакте. Аминокислотные остатки контактной границы раздела могут находиться в непрерывной или прерывающейся последовательности. Например, когда граница раздела является трехмерной, аминокислотные остатки в пределах границы раздела могут быть разделены в различных положениях на линейной последовательности.

Термин «линкер» относится к линкерному звену, которое связывает два полипептидных фрагмента. Линкеры обычно обладают некоторой гибкостью, так что применение линкеров не приводит к потере исходной функции белкового домена. В настоящем документе линкеры, присутствующие в одной и той же структуре, могут быть идентичными или различными. Линкер может представлять собой пептидный линкер, содержащий одну или более аминокислот, обычно около 1-30, 2-24 или 3-15 аминокислот. Линкеры, используемые в настоящем документе, могут быть идентичными или различными. В некоторых вариантах осуществления линкер выбран из линкера  $(G_xS)_y$ , где  $x$  выбран из группы, состоящей из целых чисел от 1 до 5,  $y$  выбран из группы, состоящей из целых чисел от 0 до 6, и когда  $y$  равен 0, линкер представляет собой связь, и две полипептидные цепи непосредственно связаны этой связью; в некоторых вариантах осуществления предложен линкер  $(G_xS)_y$ , где  $x$  представляет собой целое число от 1 до 5 (например,  $x$  равен 4), и  $y$  представляет собой целое число, выбранное из от 1 до 6 (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6); например, линкер представляет собой полипептид «GGGGS» (SEQ ID NO: 175) или «GGGSGGGGS» (SEQ ID NO: 176). В некоторых других вариантах осуществления линкер представляет собой С-концевую усеченную последовательность константной области тяжелой цепи CH1 (т.е. пептидную последовательность, образованную усечением С-концевой части CH1 и сохранением N-концевой части CH1, где, например, С-концевая усеченная последовательность CH1 представляет собой полипептид, образованный из аминокислотных остатков в положениях от 1 до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 N-конца CH1, например, полипептид «ASTKG», образованный из аминокислотных остатков в положениях от 1 до 5 (SEQ ID NO: 173); или С-концевую усеченную последовательность константной области легкой цепи CL (т.е. пептидная последовательность, полученная путем усечения С-концевой части CL и сохранением N-концевой части CL, где, например, С-концевая усеченная последовательность CL представляет собой полипептид, образованный из аминокислотных остатков в положениях от 1 до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20

N-конца CL, например, «RTVAS», образованный из аминокислотных остатков в положениях от 1 до 5 (SEQ ID NO: 174). В некоторых вариантах осуществления линкер 1 представляет собой полипептид «ASTKG», и линкер 2 представляет собой полипептид «RTVAS», или линкер 1 и линкер 2 оба представляют собой полипептиды «GGGGS» или полипептиды «GGGSGGGGS».

«Tm» представляет собой температуру растворения и денатурации (эндогенная флуоресценция). Когда белок денатурируется (посредством нагревания или с использованием денатурирующего вещества), третичная структура открывается и микроокружение ароматической аминокислоты изменяется, что приводит к изменению флуоресцентного эмиссионного спектра. В настоящем изобретении Tm1 относится к температуре, при которой значение флуоресценции изменяется до половины максимального значения.

«Tonset» представляет собой температуру начала денатурации. Она относится к температуре, при которой белок начинает денатурировать, то есть к температуре, при которой значение флуоресценции начинает изменяться.

«Tagg» представляет собой температуру начала агрегации. Температура, при которой образец начинает агрегировать, контролируется путем обнаружения агрегатов на двух длинах волн 266 нм и 473 нм путем статического рассеяния света. Tagg 266 относится к температуре начала агрегации, контролируемой при 266 нм.

«Чистота SEC (%)» или «SEC %» относится к процентному содержанию мономера SEC.  $SEC \% = A_{\text{мономер}} / A_{\text{общая}} \times 100\%$  (A мономер представляет собой площадь пика основного пика мономера в образце, и A общая представляет собой сумму площадей всех пиков). В настоящем изобретении SEC % антитела можно определить с помощью молекулярной эксклюзионной хроматографии (способ анализа разделения растворенного вещества по относительной зависимости между размером пор гелевых пор и размером молекулярной спирали образца полимера). Прибор для определения SEC: Agilent 1260; колонка: waters, XBrige BEH200Å SEC (300 × 7,8 мм, 3,5 мкм).

«NR-CE-SDS %» или «чистота NR-CE-SDS (%)» относится к процентной чистоте согласно невозстанавливающему капиллярному электрофорезу.  $NR-CE-SDS \% = A_{\text{основной пик}} / A_{\text{общая}} \times 100\%$  (A основной пик представляет собой площадь основного пика легкой цепи + площадь основного пика тяжелой цепи, и A общая представляет собой сумму всех площадей пика). В настоящем изобретении NR-CE-SDS % антитела можно определить с помощью капиллярного гель-электрофореза NR-CE (способ электрофореза, при котором гель переносят в капиллярную трубку в качестве поддерживающей среды, а образец отделяют в соответствии с его молекулярной массой при определенном

напряжении). Прибор для определения NR-CE-SDS представляет собой, например: Beckman модель плюс 800.

Антитела по настоящему изобретению могут представлять собой антитела, полученные от животных (например, антитела, полученные от мыши, птицы, кролика, верблюда и обезьяны), химерные антитела, гуманизированные антитела и полностью человеческие антитела.

Термин «химерное» антитело относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи в антителе происходит из конкретного источника или вида, в то время как остальная часть тяжелой и/или легкой цепи происходит из другого источника или вида.

Термин «гуманизированное» антитело относится к антителу, которое сохраняет реакционную способность нечеловеческого антитела, обладая при этом низкой иммуногенностью для человека. Например, это может быть достигнуто путем сохранения нечеловеческих CDR-областей и замены остальной части антитела его человеческими аналогами (т.е. константными областями и частью каркасной области переменных областей).

Термины «человеческое антитело», «антитело человеческого происхождения», «полностью человеческое антитело» и «абсолютно человеческое антитело» используются взаимозаменяемо и относятся к антителам, в которых переменные и константные области представляют собой последовательности человека. Термин охватывает антитела, которые получены из генов человека, но имеют, например, последовательности, которые были изменены, например, для снижения возможной иммуногенности, повышения аффинности, устранения цистеинов, которые могут вызывать нежелательную укладку, или генерирования сайтов гликозилирования. Термин охватывает антитела, рекомбинантно продуцируемые в клетках, не являющихся человеческими, которые могут давать гликозилирование, не характерное для клеток человека. Термин также охватывает антитела, которые культивировали у трансгенных мышей, содержащих некоторые или все локусы тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина человека. Определение человеческого антитела конкретно исключает гуманизированные антитела, содержащие антигенсвязывающие остатки, не являющиеся человеческими.

Термин «аффинность» относится к общей силе нековалентного взаимодействия между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, используемый в данном документе термин «аффинность» связывания относится к аффинности внутреннего связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее лиганду Y обычно может

быть обозначена константой диссоциации ( $K_D$ ). Аффинность может быть определена обычными способами, известными в данной области техники, включая описанные в данном документе.

В данном документе термин « $k_{ассоц}$ » или « $k_a$ » относится к скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, а термин « $k_{дисс}$ » или « $k_d$ » относится к скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Термин « $K_D$ » относится к константе диссоциации, которая получена из отношения  $k_d$  к  $k_a$  (т.е.  $k_d/k_a$ ) и обозначается молярной концентрацией (M). Значение  $K_D$  антитела может быть определено с использованием способов, хорошо известных в данной области техники. Например, поверхностный плазмонный резонанс определяют с использованием биосенсорной системы, такой как система, или аффинность в растворе определяют с помощью титрования при равновесии в растворе (SET).

Термин «эффекторная функция» относится к биологической активности, которая может быть отнесена к области Fc антитела (либо к нативной последовательности области Fc, либо к варианту аминокислотной последовательности области Fc) и варьируется в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают, но не ограничиваются: связывание C1q и комплемент-зависимую цитотоксичность, связывание с Fc-рецептором, антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), фагоцитоз, понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, рецепторов В-клеток) и активацию В-клеток.

Термин «моноклональное антитело» относится к популяции по существу гомогенных антител, то есть аминокислотные последовательности молекул антител, содержащихся в популяции, идентичны, за исключением небольшого количества природных мутаций, которые могут существовать. Напротив, составы поликлональных антител обычно содержат множество различных антител, имеющих различные аминокислотные последовательности в своих вариабельных доменах, которые, как правило, специфичны для различных эпитопов. «Моноклональный» относится к характеристикам антитела, полученного из по существу гомогенной популяции антител, и не должен толковаться как требующий продукции антитела каким-либо конкретным способом. В некоторых вариантах осуществления предложенное в настоящем изобретении антитело представляет собой моноклональное антитело.

Термин «антиген» относится к молекуле или части молекулы, которая способна связываться с селективным связывающим агентом, таким как антигенсвязывающий белок (включая, например, антитело), и которая в других обстоятельствах может быть использована у животного для получения антитела, которое способно связываться с

антигеном. Антиген может иметь один или более эпитопов, способных взаимодействовать с различными антигенсвязывающими белками (например, антителами).

Термин «эпитоп» относится к области или участку на антигене, который способен специфически связываться с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Эпитопы могут быть образованы из смежных цепей аминокислот (линейный эпитоп) или содержать несмежные аминокислоты (конформационный эпитоп), например, находящиеся в пространственной близости из-за укладки антигена (т.е. третичной укладки белкового антигена). Разница между конформационным эпитопом и линейным эпитопом заключается в том, что в присутствии денатурирующих растворителей связывание антитела с конформационным эпитопом теряется. Эпитоп содержит по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Скрининг на антитела, которые связываются с конкретными эпитопами (т.е. те, которые связываются с идентичными эпитопами), можно проводить с использованием обычных способов в данной области техники, включая, например, но не ограничиваясь, аланиновое сканирование, пептидный блоттинг, анализ расщепления пептида, иссечение эпитопа, экстракцию эпитопа, химическую модификацию антигена (Prot. Sci. 9 (2000) 487-496) и перекрестное блокирование.

Термин «способный специфически связываться», «специфически связывающийся» или «связывание» означает, что антитело способно связываться с определенным антигеном или эпитопом в антигене с более высокой аффинностью, чем с другими антигенами или эпитопами. Как правило, антитело связывается с антигеном или эпитопом в антигене с равновесной константой диссоциации ( $K_D$ ), составляющей около  $1 \times 10^{-7}$  или менее (например, около  $1 \times 10^{-8}$  М или менее). В некоторых вариантах осуществления  $K_D$  для связывания антитела с антигеном составляет 10 % или менее (например, 1 %) от  $K_D$  для связывания антитела с неспецифическим антигеном (например, BSA или казеином).  $K_D$  можно определить с использованием известных способов, например, с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса BIACORE®. Однако антитело, которое специфически связывается с антигеном или эпитопом в антигене, может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, с соответствующими антигенами других видов (гомологичных), таких как люди или обезьяны, например, *Macaca fascicularis* (яванский макак, cyno), *Pan troglodytes* (шимпанзе, chimp) или *Callithrix jacchus* (обыкновенная мартышка, мармозетка).

Термин «антителозависимая клеточная цитотоксичность», «антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» или «ADCC» представляет собой механизм индуцирования гибели клеток, который зависит от взаимодействия клеток-мишеней,

покрытых антителами, с эффекторными клетками с литической активностью, такими как естественные киллерные клетки (NK), моноциты, макрофаги и нейтрофилы, через Fcγ-рецептор (FcγR), экспрессируемый на эффекторных клетках. Например, NK-клетки экспрессируют FcγRIIIa, в то время как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIIIa. Активность ADCC антител, предложенных в настоящем документе, можно оценить с помощью анализов *in vitro* с использованием клеток, экспрессирующих антиген, в качестве клеток-мишеней и NK-клеток в качестве эффекторных клеток. Лизис клеток обнаруживают на основании высвобождения метки (например, радиоактивного субстрата, флуоресцентного красителя или природного внутриклеточного белка) из лизированных клеток.

Термин «антителозависимый клеточный фагоцитоз» («ADCP») относится к механизму, посредством которого клетки-мишени, покрытые антителом, элиминируются путем интернализации фагоцитарных клеток, таких как макрофаги или дендритные клетки.

Термин «комплемент-зависимая цитотоксичность» или «CDC» относится к механизму индукции гибели клеток, при котором эффекторный домен Fc антитела, связывающегося с мишенью, связывается и активирует компонент комплемента C1q, а C1q затем активирует каскад комплемента, что приводит к гибели клетки-мишени. Активация комплемента также может приводить к отложению компонентов комплемента на поверхности клеток-мишеней, что способствует CDC путем связывания с рецепторами комплемента на лейкоцитах (например, CR3).

Термин «нуклеиновая кислота» используется в настоящем документе взаимозаменяемо с термином «полинуклеотид» и относится к дезоксирибонуклеотиду или рибонуклеотиду и их полимеру в одноцепочечной или двухцепочечной форме. Термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные нуклеотидные аналоги или модифицированные каркасные остатки или связи, которые являются синтетическими, встречающимися в природе и не встречающимися в природе, имеющие сходные связывающие свойства с референсной нуклеиновой кислотой, и которые метаболизируются таким же образом, что и референсный нуклеотид. Примеры таких аналогов включают, но не ограничиваются, тиофосфат, фосфорамидат, метилфосфонат, хиралметилфосфонат, 2-О-метилрибонуклеотид и пептиднуклеиновую кислоту (PNA). «Выделенная» нуклеиновая кислота относится к молекуле нуклеиновой кислоты, отделенной от компонентов своего естественного окружения. Выделенная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетке, которая обычно содержит молекулу нуклеиновой кислоты, но молекула нуклеиновой кислоты присутствует внехромосомно или в хромосомном положении, отличном от ее естественного хромосомного положения.

Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид или слитый белок, относится к одной или более молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим полипептид или слитый белок, включая такие одну или более молекул нуклеиновой кислоты в одном векторе или отдельных векторах, и такие одна или более молекул нуклеиновой кислоты присутствуют в одном или более положениях в клетке-хозяине. Если не указано иное, конкретная нуклеотидная последовательность также в неявной форме охватывает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов) и комплементарные последовательности, а также конкретно указанную последовательность. В частности, как подробно описано ниже, замены вырожденных кодонов могут быть получены путем генерирования последовательностей, в которых третье положение одного или более выбранных (или всех) кодонов замещено смешанными основаниями и/или остатками дезоксинозина.

Термин «идентичность» последовательности относится к степени (проценту), в которой аминокислоты/нуклеиновые кислоты двух последовательностей идентичны в эквивалентных положениях, когда две последовательности оптимально выровнены, с гэпами, введенными по мере необходимости, для достижения максимального процента идентичности последовательности, и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательности. Для определения процентной идентичности последовательностей выравнивания могут быть выполнены методами, известными специалистам в данной области техники, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить параметры, подходящие для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания всей длины выровненных последовательностей.

В настоящем изобретении, например, «положение относительно последовательности XX» означает положение тестируемой последовательности, соответствующее положению последовательности XX, то есть относительное положение двух последовательностей, когда тестируемая последовательность оптимально выровнена с последовательностью XX для получения наивысшего процента идентичности. Например, в цепи титин-Т положение согласно нумерации естественной последовательности SEQ ID NO: 127 относительно положения 1 согласно нумерации естественных последовательностей в последовательности SEQ ID NO: 32 представляет собой положение 6; в качестве другого примера, в цепи обскурин-О положение согласно нумерации естественных последовательностей SEQ ID NO: 128 относительно положения 3 согласно

нумерации естественных последовательностей в последовательности SEQ ID NO: 33 представляет собой положение 8.

Термин «вектор» означает полинуклеотидную молекулу, способную транспортировать другой связанный с ней полинуклеотид. Один тип вектора представляет собой «плазмиду», которая означает циклическую двухцепочечную петлю ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, такой как аденоассоциированный вирусный вектор (AAV или AAV2), где дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы с бактериальным происхождением репликации и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяин и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Термин «вектор экспрессии» или «экспрессионная конструкция» относится к вектору, который может быть трансформирован в клетку-хозяина, и содержит нуклеотидную последовательность, которая направляет и/или контролирует (вместе с клеткой-хозяином) экспрессию одной или более гетерологичных кодирующих областей, функционально связанных с ней. Экспрессионные конструкции могут включать, но не ограничиваются, последовательности, которые влияют или контролируют транскрипцию и трансляцию и влияют на сплайсинг РНК кодирующей области, функционально связанной с ней, в присутствии интрона.

Термины «клетка-хозяин», «линия клеток-хозяев» и «культура клеток-хозяев» используются как взаимозаменяемые и относятся к клеткам, в которые ввели экзогенную нуклеиновую кислоту, включая потомства таких клеток. Клетки-хозяева включают «трансформанты» и «трансформированные клетки», которые включают первичные трансформированные клетки и полученные из них потомства, независимо от количества переносов. Потомство может не быть точно таким же как родительские клетки с точки зрения содержания нуклеиновой кислоты и может содержать мутации. Мутантные потомства, которые имеют ту же функцию или биологическую активность, что и клетки, прошедшие скрининг или выбранные из группы, состоящей из первоначально трансформированных клеток, включены в настоящий документ. Клетки-хозяева включают прокариотические и эукариотические клетки-хозяева, где эукариотические клетки-хозяева включают, но не ограничиваются, клетки млекопитающих, клеточные линии насекомых, клетки растений и клетки грибов. Клетки-хозяева млекопитающих включают клетки человека, мыши, крысы, собаки, обезьяны, свиньи, козы, быка, лошади и хомяка, включая,



но не ограничиваясь, клетки яичника китайского хомяка (CHO), NSO, клетки SP2, клетки HeLa, клетки почек новорожденного хомяка (BHK), клетки почек обезьяны (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Hep G2), клетки A549, клетки 3T3 и клетки HEK-293. Клетки грибов включают дрожжевые и нитчатые грибковые клетки, включая, например, *Pichia pastoris*, *Pichia finlandica*, *Pichia trehalophila*, *Pichia koclamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia minuta* (*Ogataea minuta*, *Pichia lindneri*), *Pichia opuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia guercuum*, *Pichia pijperi*, *Pichia stiptis*, *Pichia metanolica*, *Pichia*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium* sp., *Fusarium gramineum*, *Fusarium venenatum*, *Physcomitrella patens* и *Neurospora crassa*. *Pichia*, любые *Saccharomyces*, *Hansenula polymorpha*, любые *Kluyveromyces*, *Candida albicans*, любые *Aspergillus*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, любые *Fusarium*, *Yarrowia lipolytica* и *Neurospora crassa*.

В данном контексте выражения «клетка», «клеточная линия» и «клеточная культура» используются взаимозаменяемо, и все такие обозначения включают их потомство. Таким образом, слова «трансформант» и «трансформированная клетка» включают первичную клетку субъекта и культуры, полученные из нее, независимо от количества переносов. Также понятно, что не все потомки имеют точно идентичные содержания ДНК из-за преднамеренных или непреднамеренных мутаций. Включены варианты потомства, которые имеют ту же функцию или биологическую активность, что и исходная трансформированная клетка, из которой они были выбраны.

Термин «необязательный» или «необязательно» означает, что событие или обстоятельство, описанное далее, может, но не обязательно, иметь место, и что такое описание включает случаи, когда событие или обстоятельство происходит или не происходит.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к смеси, содержащей одну или более антигенсвязывающих молекул, описанных в настоящем документе, и другие химические компоненты, например, физиологические/фармацевтически приемлемые носители и эксципиенты.

Термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту в фармацевтической композиции, который отличается от активного ингредиента и не токсичен для субъекта. Фармацевтически приемлемые носители включают, но не ограничиваются, буферы, эксципиенты, стабилизаторы или консерванты.

Термин «субъект» или «индивидуум» включает человека или животных, отличных

от человека. Животные, отличные от человека, включают всех позвоночных (например, млекопитающих и не млекопитающих), таких как приматы, отличные от человека (например, яванские макаки), овцы, собаки, коровы, куры, земноводные и рептилии. Если не указано иное, термины «пациент» и «субъект» используются в настоящем документе взаимозаменяемо. В данном контексте термин «яванский макак (Суно)» или «яванский макак» относится к *Macaca fascicularis*. В некоторых вариантах осуществления индивидуум или субъект представляет собой человека.

Термины «введение» или «обработка», когда они применяются к животным, людям, экспериментальным субъектам, клеткам, тканям, органам или биологическим жидкостям, относятся к приведению экзогенного лекарственного средства, терапевтического агента, диагностического агента или композиции в контакт с животными, людьми, субъектами, клетками, тканями, органами или биологическими жидкостями.

Термин «образец» относится к коллекции аналогичных жидкостей, клеток или тканей, выделенных у субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих у субъекта. Иллюстративные образцы представляют собой биологические жидкости (такие как кровь; сыворотка; серозные жидкости; плазма; лимфа; моча; слюна; кистозные жидкости; слезы; выделения; мокрота; слизистые выделения секреторной ткани и органов; влагалищные выделения; асцит; жидкости в плевре; перикарде; перитонеальной полости; брюшной полости и других полостях тела; жидкости, собранные из бронхиального лаважа; синовиальные жидкости; жидкие растворы, контактирующие с субъектом или биологическим источником, например, клеточные и органные культуральные среды (включая клеточные или органные кондиционированные среды); промывные жидкости; и тому подобное), образцы тканей для биопсии, пункции тонкими иглами, хирургически иссеченные ткани, органические культуры или клеточные культуры.

«Лечение» или «лечить» (и их грамматические вариации) относится к клиническому вмешательству с целью изменения естественного течения у субъекта, получающего лечение, которое может быть выполнено либо для предотвращения, либо в ходе клинической патологии. Желательные эффекты лечения включают, но не ограничиваются, предотвращение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, облегчение/уменьшение любых косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или облегчение болезненного состояния и регрессию или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению применяют для задержки развития или замедления прогрессирования заболевания.

«Эффективное количество», как правило, представляет собой количество,

достаточное для уменьшения тяжести и/или частоты симптомов, устранения симптомов и/или основных причин, предотвращения появления симптомов и/или их основных причин и/или облегчения или улучшения повреждения (например, заболевания легких), вызванного или связанного с болезненным состоянием. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой терапевтически эффективное количество или профилактически эффективное количество. «Терапевтически эффективное количество» представляет собой количество, достаточное для лечения болезненного состояния или патологического состояния, в частности, состояния или патологического состояния, связанного с болезненным состоянием, или для того, чтобы каким-либо иным образом предотвратить, затруднить, задержать или обратить прогрессирование болезненного состояния или любых других нежелательных симптомов, связанных с заболеванием. «Профилактически эффективное количество» представляет собой количество, которое при введении субъекту будет оказывать предопределенный профилактический эффект, например, предотвращая или задерживая начало (или рецидив) болезненного состояния или уменьшая вероятность начала (или рецидива) болезненного состояния или связанных с ним симптомов. Полный терапевтический или профилактический эффект не обязательно возникает после введения одной дозы и может возникать после введения серии доз. Таким образом, терапевтически или профилактически эффективное количество можно вводить в одной или более дозах. «Терапевтически эффективное количество» и «профилактически эффективное количество» могут варьироваться в зависимости от множества факторов, таких как болезненное состояние, возраст, пол и вес индивидуума, а также способность терапевтического агента или комбинации терапевтических агентов вызывать желаемый ответ у индивидуума. Примеры показателей эффективного терапевтического агента или комбинации терапевтических агентов включают, например, улучшение состояния здоровья пациента.

Димеризованный полипептид и антигенсвязывающая молекула, содержащая димеризованный полипептид по настоящему изобретению

В одном аспекте настоящего изобретения сконструированы различные димеризованные полипептиды. Каждый из димеризованных полипептидов содержит цепь титин-Т и цепь обскурин-О или цепь обскурин-подобный-О и может быть использован для замены CH1/CL антитела для уменьшения неправильного спаривания между тяжелыми/легкими цепями мультиспецифического антитела (например, биспецифического антитела) без влияния на связывание антитела с антигеном.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к

димеризованному полипептиду, который содержит цепь титин-Т и цепь обскурин-О или цепь обскурин-подобный-О.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к димеризованному полипептиду, где описанная выше цепь титин-Т содержит одну или более замен аминокислотного остатка в положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 8, 20, 22, 25, 26 и 39, и/или цепь обскурин-О содержит одну или более мутаций аминокислотного остатка в положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 3, 9, 25, 76 и 88; или цепь титин-Т содержит одну или более мутаций аминокислотного остатка в положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 8, 20, 22, 25, 26 и 39, и/или цепь обскурин-подобный-О содержит одну или более мутаций аминокислотного остатка в положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 6, 26, 74, 77, 84 и 86; положения мутации в цепи титин-Т представляют собой положения согласно нумерации естественной последовательности относительно последовательности SEQ ID NO: 32; положения мутации в цепи обскурин-О представляют собой положения согласно нумерации естественной последовательности относительно последовательности SEQ ID NO: 33; положения мутации в цепи обскурин-подобный-О представляют собой положения согласно нумерации естественных последовательностей относительно последовательности SEQ ID NO: 34.

В некоторых конкретных вариантах осуществления цепь титин-Т, описанная выше, содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 8С, 20С, 22С, 25S, 26С и 39Т, и/или цепь обскурин-О содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 3С, 9С, 25S, 76 и 88С; или цепь титин-Т содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 8С, 20С, 22С, 25S, 26С и 39Т, и/или цепь обскурин-подобный-О содержит одну или более мутаций аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 6Е, 26S, 74С, 77S, 84С и 86С. В некоторых вариантах осуществления цепь титин-Т и цепь обскурин-О или цепь титин-Т и цепь обскурин-подобный-О содержат следующие замены аминокислотных остатков: замены 25S, 39Т и 8С для цепи титин-Т и замену 88С для цепи обскурин-О; замены 25S, 39Т и 20С для цепи титин-Т и замену 3С для цепи обскурин-О; замены 25S, 39Т и 26С для цепи титин-Т и замену 9С для цепи обскурин-О; замены 25S, 39Т, и 8С для цепи титин-Т и замены 25S, 76S и 88С для цепи обскурин-О; замены 25S, 39Т и 20С для цепи титин-Т и замены 25S, 76S и 3С для цепи обскурин-О; замены 25S, 39Т и 26С для цепи титин-Т и замены 25S, 76S и 9С для цепи обскурин-О; замены 25S, 39Т и 8С для цепи титин-Т и замены 6Е и 74С для цепи обскурин-подобный-О; замены 25S, 39Т и 20С для цепи титин-Т и замены 6Е и 84С для цепи обскурин-

подобный-О; замены 25S, 39Т и 22С для цепи титин-Т и замены 6Е и 86С для цепи обскурин-подобный-О; замены 25S, 39Т и 8С для цепи титин-Т и замены 6Е, 26S, 77S и 74С для цепи обскурин-подобный-О; замены 25S, 39Т и 20С для цепи титин-Т и замены 6Е, 26S, 77S и 84С для цепи обскурин-подобный-О; или замены 25S, 39Т и 22С для цепи титин-Т и замены 6Е, 26S, 77S и 86С для цепи обскурин-подобный-О. В некоторых вариантах осуществления титин-Т содержит замены положений, описанные выше, на основе SEQ ID NO: 32 или 127; цепь обскурин-О содержит замены положений, описанные выше, на основе SEQ ID NO: 33 или 128; цепь обскурин-подобный-О содержит замены положений, описанные выше, на основе SEQ ID NO: 34.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид, описанный выше, где описанная выше цепь обскурин-О содержит одну или более мутаций аминокислотного остатка в положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 7, 11 и 62. В некоторых вариантах осуществления цепь обскурин-О содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 7R или 7K, 62K или 62H и 11L; в некоторых вариантах осуществления цепь титин-Т содержит замены 25S, 39Т и 8С, и цепь обскурин-О содержит замены 25S, 76S, 88С, 7К и 62К; цепь титин-Т содержит замены 25S, 39Т и 8С, и цепь обскурин-О содержит замены 25S, 76S, 88С, 7К и 62H; цепь титин-Т содержит замены 25S, 39Т и 8С, и цепь обскурин-О содержит замены 25S, 76S, 88С, 11L и 62К; или цепь титин-Т содержит замены 25S, 39Т и 8С, и цепь обскурин-О содержит замены 25S, 76S, 88С, 11L и 62H. В некоторых вариантах осуществления цепь обскурин-О содержит замены в положениях, описанные выше, на основе SEQ ID NO: 33 или 45. Положения для замен в цепи титин-Т представляют собой положения согласно нумерации естественных последовательностей относительно последовательности SEQ ID NO: 32; положения для замен в цепи обскурин-О представляют собой положения согласно нумерации естественных последовательностей относительно последовательности SEQ ID NO: 33.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид, описанный выше, где описанная выше цепь титин-Т содержит одну или более аминокислотных мутаций в положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 33, 11, 13, 22, 40, 42, 45, 47, 49, 56, 58, 66, 70, 75, 77, 79, 81, 82, 83 и 84, и/или цепь обскурин-О содержит одну или более аминокислотных мутаций, выбранных из группы, состоящей из положений 2, 11, 12, 13, 14, 17, 20, 22, 30, 32, 34, 36, 41, 42, 44, 45, 53, 58, 62, 67, 69, 89, 92, 94 и 97. Положения мутаций в цепи титин-Т представляют собой положения согласно нумерации естественных последовательностей относительно последовательности SEQ ID NO: 35; положения мутаций в цепи обскурин-О представляют собой положения согласно

нумерации естественных последовательностей относительно последовательности SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления цепь титин-Т содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из 3W, 11I, 13L, 22M, 40S, 42K, 45S, 47E, 49G, 56S, 58E, 66S или 66K, 70R, 75V, 77S, 79T, 81R, 82M, 83D и 84L, и/или цепь обскурин-О содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из 2E, 11K, 12S, 13Y, 14T, 17E, 20L, 22M или 22S, 30D, 32P, 34E, 36T, 41K, 42L, 44I, 45T, 53L, 58V, 62E, 67Q или 67T, 69S, 89L, 92E, 94G и 97G. В некоторых вариантах осуществления цепь титин-Т содержит аминокислотные замены 66S и 77S, и/или цепь обскурин-О содержит аминокислотные замены 11K, 12S, 13Y, 14T и 22S; цепь титин-Т содержит аминокислотные замены 66K, 70R, 79T и 81R, и/или цепь обскурин-О содержит аминокислотные замены 2E, 17E, 30D, 32P, 34E, 36T, 44I, 45T, 58V, 62E, 67Q, 69S и 97G; цепь титин-Т содержит аминокислотные замены 3W, 11I, 13L, 22M и 82M, и/или цепь обскурин-О содержит аминокислотные замены 20L, 22M и 53L; цепь титин-Т содержит аминокислотные замены 11I, 66K, 79T и 81R, и/или цепь обскурин-О содержит аминокислотные замены 41K, 45T, 67Q, 69S и 89L; цепь титин-Т содержит аминокислотные замены 40S, 42K, 45S, 47E, 49G, 56S, 58E, 75V, 83D и 84L, и/или цепь обскурин-О содержит аминокислотные замены 42L, 45T, 67T, 69S, 92E и 94G; цепь титин-Т содержит аминокислотные замены 47E, 49G, 56S, 58E и 75V, и/или цепь обскурин-О содержит аминокислотные замены 42L, 45T, 67T, 69S, 92E и 94G; цепь титин-Т содержит аминокислотные замены 56S, 58E и 75V, и/или цепь обскурин-О содержит аминокислотные замены 42L, 45T, 67T, 69S, 92E и 94G; или цепь титин-Т содержит аминокислотные замены 56S, 58E, 66S и 77S, и/или цепь обскурин-О содержит аминокислотные замены 12S, 13Y, 22S, 42L, 45T, 67Q, 69S, 92E и 94G; положения для замен в цепи титин-Т представляют собой положения согласно нумерации естественных последовательностей относительно последовательности SEQ ID NO: 35; положения для замен в цепи обскурин-О представляют собой положения согласно нумерации естественных последовательностей относительно последовательности SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления цепь титин-Т содержит аминокислотные замены на основе SEQ ID NO: 35, а цепь обскурин-О содержит аминокислотные замены на основе SEQ ID NO: 50.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид, описанный выше, где цепь титин-Т дополнительно содержит одну или более мутаций аминокислотного остатка в положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 60 и 64, и/или цепь обскурин-О содержит одну или более мутаций аминокислотного остатка в положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 13, 32, 48, 66, 82 и 93; положения аминокислотного остатка в цепи титин-Т представляют собой положения

согласно нумерации естественных последовательностей относительно последовательности SEQ ID NO: 32; положения аминокислотного остатка в цепи обскурин-О представляют собой положения согласно нумерации естественных последовательностей относительно последовательности SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид, описанный выше, где цепь титин-Т содержит одну или более (например, 1 или 2) замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 60S и 64T, и/или цепь обскурин-О содержит одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более) замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 13S, 32F, 48V, 66C, 82H и 93C; положения аминокислотных остатков в цепи титин-Т представляют собой положения согласно нумерации естественных последовательностей относительно последовательности SEQ ID NO: 32; положения аминокислотных остатков в цепи обскурин-О представляют собой положения согласно нумерации естественных последовательностей относительно последовательности SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид, описанный выше, где цепь титин-Т содержит замены аминокислотных остатков в положениях 60S и 64T, и/или цепь обскурин-О содержит замены аминокислотных остатков, выбранные из любого из а)-с): а) замены аминокислотных остатков в положениях 13S и 48V, б) замены аминокислотных остатков в положениях 13S, 32F, 48V и 82H, и с) замены аминокислотных остатков в положениях 13S, 32F, 48V, 66C, 82H и 93C; положения аминокислотных остатков в цепи титин-Т представляют собой положения согласно нумерации естественных последовательностей относительно последовательности SEQ ID NO: 32; положения аминокислотных остатков в цепи обскурин-О представляют собой положения согласно нумерации естественных последовательностей относительно последовательности SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид, описанный выше, где цепь титин-Т, описанная выше, содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 60S и 64T в SEQ ID NO: 32, 68 или 127, и цепь обскурин-О содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 13S, 32F, 48V, 66C, 82H и 93C в SEQ ID NO: 33, 80 или 128. Положения аминокислотных остатков в цепи титин-Т представляют собой положения согласно нумерации естественных последовательностей относительно последовательности SEQ ID NO: 32; положения аминокислотных остатков в цепи обскурин-О представляют собой положения согласно нумерации естественных последовательностей относительно последовательности SEQ ID NO: 33.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид, описанный выше, где один или более остатков в положениях, выбранных из группы,

состоящей из положений 7-15, 19-24, 26, 55, 59 и 60, в цепи титин-Т связываются с одним или более остатками в положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 3-6, 9, 41, 73, 75 и 80-90, в цепи обскурин-О с образованием димеризованного комплекса, или один или более остатков в положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 1, 7-10, 13-16, 19-26, 59-60 и 96, в цепи титин-Т связываются с одним или более остатками в положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 4-5, 10, 12-13, 74, 76, 78 и 82-91, в цепи обскурин-подобный-О с образованием димеризованного комплекса; положения остатков в цепи титин-Т представляют собой положения согласно нумерации естественных последовательностей относительно последовательности SEQ ID NO: 32; положения остатков в цепи обскурин-О представляют собой положения согласно нумерации естественных последовательностей относительно последовательности SEQ ID NO: 33; положения остатков в цепи обскурин-подобный-О представляют собой положения согласно нумерации естественных последовательностей относительно последовательности SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления цепь титин-Т содержит аминокислоты в положениях 7-60 SEQ ID NO: 32 или ее мутанта, и цепь обскурин-О содержит аминокислоты в положениях 3-90 SEQ ID NO: 33 или ее мутанта; или цепь титин-Т содержит аминокислоты в положениях 1-96 SEQ ID NO: 32 или ее мутанта, и цепь обскурин-подобный-О содержит аминокислоты в положениях 4-91 SEQ ID NO: 34 или ее мутанта.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид, который содержит цепь титин-Т и цепь обскурин-О или цепь титин-Т и цепь обскурин-подобный-О, где: i) цепь титин-Т представляет собой вариант SEQ ID NO: 32, причем указанный вариант содержит замены аминокислотных остатков в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 60 и 64, по сравнению с SEQ ID NO: 32, и/или ii) цепь обскурин-О представляет собой вариант SEQ ID NO: 33, причем указанный вариант содержит замены аминокислотного остатка в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 13, 32, 48, 66, 82 и 93, по сравнению с SEQ ID NO: 33; и: а) когда вариант не содержит замены аминокислотного остатка в положении 13, 48, 66, 82 или 93 и содержит замену аминокислотного остатка в положении 32, замена аминокислоты в положении 32 не представляет собой 32P; б) когда вариант не содержит замены аминокислотного остатка в положении 32, 48, 66, 82 или 93 и содержит замену аминокислотного остатка в положении 13, аминокислотная замена в положении 13 не представляет собой 13Y; и с) когда вариант не содержит замены аминокислотного остатка в положении 48, 66, 82 или 93 и содержит замены аминокислотного остатка в положениях 13 и 32, замена аминокислотного остатка в



положении 13 не представляет собой 13Y, и замена аминокислотного остатка в положении 32 не представляет собой 32P.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид, где вариант SEQ ID NO: 32 содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 60S и 64T, по сравнению с SEQ ID NO: 32, и/или вариант SEQ ID NO: 33 содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 13S, 32F, 48V, 66C, 82H и 93C, по сравнению с SEQ ID NO: 33.

В некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 32 содержит аминокислотные замены 60S и 64T по сравнению с SEQ ID NO: 32, и/или вариант SEQ ID NO: 33 содержит замены аминокислотных остатков, выбранные из любого из а)-с), по сравнению с SEQ ID NO: 32: а) 32F и 48V; б) 13S, 32F, 48V и 82H; и с) 13S, 32F, 48V, 66C, 82H и 93C.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид, где вариант SEQ ID NO: 32 дополнительно содержит замены аминокислотных остатков в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 3, 8, 11, 13, 20, 22, 25, 26, 39, 40, 42, 45, 47, 49, 56, 58, 66, 70, 75, 77, 79, 81, 82, 83 и 84, по сравнению с SEQ ID NO: 32; в некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 32 дополнительно содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 3W, 8C, 11I, 13L, 20C, 22M/22C, 25S, 26C, 39T, 40S, 42K, 45S, 47E, 49G, 56S, 58E, 66S/66K, 70R, 75V, 77S, 79T, 81R, 82M, 83D и 84L, по сравнению с SEQ ID NO: 32; в некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 32 дополнительно содержит замены аминокислотных остатков, выбранные из любого из а)-l), по сравнению с SEQ ID NO: 32: а) 8C, 25S и 39T; б) 20C, 25S и 39T; в) 25S, 26C и 39T; г) 22C, 25S и 39T; д) 8C, 25S, 39T, 66S и 77S; е) 8C, 25S, 39T, 66K, 70R, 79T и 81R; ж) 3W, 8C, 11I, 13L, 22M, 25S, 39T и 82M; з) 8C, 11I, 25S, 39T, 66K, 79T и 81R; и) 8C, 25S, 39T, 40S, 42K, 45S, 47E, 49G, 56S, 58E, 75V, 83D и 84L; j) 8C, 25S, 39T, 47E, 49G, 56S, 58E и 75V; к) 8C, 25S, 39T, 56S, 58E и 75V; и l) 8C, 25S, 39T, 56S, 58E, 66S и 77S; в некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 32 содержит замены аминокислотных остатков, выбранные из любого из А)-С), по сравнению с SEQ ID NO: 32: А) 8C, 11I, 25S, 39T, 60S, 64T, 66K, 79T и 81R; В) 8C, 11I, 20C, 25S, 39T, 60S, 64T, 66K, 79T и 81R; и С) 8C, 11I, 25S, 26C, 39T, 60S, 64T, 66K, 79T и 81R.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид, где вариант SEQ ID NO: 33 дополнительно содержит замены аминокислотных остатков в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 2, 3, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 17, 20, 22, 25, 30, 32, 34, 36, 41, 42, 44, 45, 53, 58, 62, 67, 69, 76, 88, 89, 92, 94 и 97, по

сравнению с SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 33 дополнительно содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 2E, 3C, 7K/7R, 9C, 11L, 12S, 13Y, 14T, 17E, 20L, 22M/22S, 25S, 30D, 32P, 34E, 36T, 41K, 42L, 44I, 45T, 53L, 58V, 62E/62K/62H, 67Q/67T, 69S, 76S, 88C, 89L, 92E, 94G и 97G, по сравнению с SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 33 дополнительно содержит замены аминокислотных остатков, выбранные из любого из A)-R), по сравнению с SEQ ID NO: 33: A) 88C; B) 3C; C) 9C; D) 25S, 76S и 88C; E) 25S, 76S и 3C; F) 25S, 76S и 9C; G) 7K, 25S, 62K, 76S и 88C; H) 7K, 25S, 62H, 76S и 88C; I) 7R, 25S, 62K, 76S и 88C; J) 7R, 25S, 62H, 76S и 88C; K) 11L, 25S, 62K, 76S и 88C; L) 11L, 25S, 62H, 76S и 88C; M) 12S, 13Y, 14T, 22S, 25S, 62K, 76S и 88C; N) 2E, 11L, 17E, 25S, 30D, 32P, 34E, 36T, 44I, 45T, 58V, 62E, 67Q, 69S, 76S, 88C и 97G; O) 11L, 20L, 22M, 25S, 53L, 62K, 76S и 88C; P) 11L, 25S, 41K, 45T, 62K, 67Q, 69S, 76S, 88C и 89L; Q) 11L, 25S, 42L, 45T, 62K, 67T, 69S, 76S, 88C, 92E и 94G; и R) 11L, 12S, 13Y, 22S, 25S, 42L, 45T, 62K, 67Q, 69S, 76S, 88C, 92E и 94G. В некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 33 содержит замены аминокислотных остатков, выбранные из любого из a)-j), по сравнению с SEQ ID NO: 33: a) 25S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 67Q, 69S, 76S, 88C и 89L; b) 13S, 25S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 67Q, 69S, 76S, 82H, 88C и 89L; c) 3C, 13S, 25S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 67Q, 69S, 76S, 82H, 88C и 89L; d) 9C, 13S, 25S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 67Q, 69S, 76S, 82H, 88C и 89L; e) 13S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 67Q, 69S, 82H, 88C и 89L; f) 3C, 13S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 67Q, 69S, 82H, 88C и 89L; g) 9C, 13S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 67Q, 69S, 82H, 88C и 89L; h) 13S, 25S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 66C, 67Q, 69S, 76S, 82H, 88C, 89L и 93C; i) 3C, 13S, 25S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 66C, 67Q, 69S, 76S, 82H, 88C, 89L и 93C; и j) 9C, 13S, 25S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 66C, 67Q, 69S, 76S, 82H, 88C, 89L и 93C.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид, где цепь обскурин-подобный-О представляет собой SEQ ID NO: 34 или ее вариант, где вариант SEQ ID NO: 34 содержит замены аминокислотных остатков в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 6, 26, 74, 77, 84 и 86, по сравнению с SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 34 содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 6E, 26S, 74C, 77S, 84C и 86C, по сравнению с SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 34 содержит замены аминокислотных остатков, выбранные из любого из A)-F), по сравнению с SEQ ID NO: 34: A) 6E и 74C, B) 6E и 84C, C) 6E и 86C, D) 6E, 26S, 77S и 74C, E) 6E, 26S, 77S и 84C, F) 6E, 26S, 77S и 86C.

В некоторых вариантах осуществления предложен димеризованный полипептид, где цепь титин-Т представляет собой вариант SEQ ID NO: 32, 68 или 127, где вариант SEQ ID

NO: 32 содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 60S и 64T, по сравнению с SEQ ID NO: 32; вариант SEQ ID NO: 68 содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 60S и 64T, по сравнению с SEQ ID NO: 68; вариант SEQ ID NO: 127 содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 60S и 64T, по сравнению с SEQ ID NO: 127; цепь обскурин-О представляет собой вариант SEQ ID NO: 33, 80 или 128, где вариант SEQ ID NO: 33 содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 13S, 32F, 48V, 66C, 82H и 93C, по сравнению с SEQ ID NO: 33; вариант SEQ ID NO: 80 содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 13S, 32F, 48V, 66C, 82H и 93C, по сравнению с SEQ ID NO: 80; вариант SEQ ID NO: 128 содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 13S, 32F, 48V, 66C, 82H и 93C, по сравнению с SEQ ID NO: 128.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула согласно любому из вышеперечисленного, которая содержит первую тяжелую цепь, первую легкую цепь, вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, где

a. первая тяжелая цепь содержит [VH1]-[линкер 1]-[цепь титин-T]-[Fc1] в порядке от N-конца к C-концу,

первая легкая цепь содержит [VL1]-[линкер 2]-[цепь обскурин-О] в порядке от N-конца к C-концу;

вторая тяжелая цепь содержит [VH2]-[CH1]-[Fc2] в порядке от N-конца к C-концу, и вторая легкая цепь содержит [VL2]-[CL] в порядке от N-конца к C-концу; или

b. первая тяжелая цепь содержит [VH1]-[линкер 1]-[цепь обскурин-О]-[Fc1] в порядке от N-конца к C-концу,

первая легкая цепь содержит [VL1]-[линкер 2]-[цепь титин-T] в порядке от N-конца к C-концу,

вторая тяжелая цепь содержит [VH2]-[CH1]-[Fc2] в порядке от N-конца к C-концу, и вторая легкая цепь содержит [VL2]-[CL] в порядке от N-конца к C-концу;

где линкер 1 и линкер 2 являются идентичными или различными; в некоторых вариантах осуществления каждая из Fc1 и Fc2 независимо содержит одну или более аминокислотных замен, которые снижают гомодимеризацию; в некоторых вариантах осуществления предложены линкер 1 и линкер 2, где: А) линкер 1 и линкер 2 оба представляют собой линкеры  $(G_xS)_y$ , где x выбран из группы, состоящей из целых чисел от 1 до 5 (например, 1, 2, 3, 4 или 5), и y выбран из группы состоящий из целых чисел от 0 до 6 (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6) (где: когда y равен 0, линкер представляет собой связь);

или В) линкер 1 представляет собой С-концевую усеченную последовательность СН1, и линкер 2 представляет собой С-концевую усеченную последовательность СL; в некоторых вариантах осуществления линкер 1 и линкер 2 выбраны из любого из А)-С): А) линкер 1, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 173; и линкер 2, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 174; В) линкер 1 и линкер 2, оба из которых имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 175; и С) линкер 1 и линкер 2, оба из которых имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 176. В некоторых вариантах осуществления Fc1 имеет структуру выступа в соответствии с методом «выступ-во-впадину», и Fc2 имеет структуру впадины в соответствии с методом «выступ-во-впадину», или Fc1 имеет структуру впадины в соответствии с методом «выступ-во-впадину», и Fc2 имеет структуру выступа в соответствии с методом «выступ-во-впадину». В некоторых вариантах осуществления Fc1 содержит одну или более аминокислотных замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из 354, 356, 358 и 366, и Fc2 содержит одну или более аминокислотных замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из 349, 356, 358, 366, 368 и 407. В некоторых вариантах осуществления Fc2 содержит одну или более аминокислотных замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из 354, 356, 358 и 366, и Fc1 содержит одну или более аминокислотных замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из 349, 356, 358, 366, 368 и 407. В некоторых вариантах осуществления Fc1 содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из 354С, 356Е, 358М и 366W, и Fc2 содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из 349С, 356Е, 358М, 366S, 368А и 407V. В некоторых вариантах осуществления Fc2 содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из 354С, 356Е, 358М и 366W, и Fc1 содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из 349С, 356Е, 358М, 366S, 368А и 407V. В некоторых вариантах осуществления Fc1 содержит аминокислотные замены 354С, 356Е, 358М и 366W, и Fc2 содержит аминокислотные замены 349С, 356Е, 358М, 366S, 368А и 407V. В некоторых вариантах осуществления Fc2 содержит аминокислотные замены 354С, 356Е, 358М и 366W, и Fc1 содержит аминокислотные замены 349С, 356Е, 358М, 366S, 368А и 407V. В некоторых вариантах осуществления Fc1 представлена в SEQ ID NO: 177, и Fc2 представлена в SEQ ID NO: 178; или Fc2 представлена в SEQ ID NO: 177, и Fc1 представлена в SEQ ID NO: 178.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула согласно любому из вышеперечисленного, которая содержит первую тяжелую цепь, первую легкую цепь, вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, где

а. первая тяжелая цепь содержит [VH1]-[линкер 1]-[цепь титин-T]-[Fc1] в порядке от

N-конца к С-концу,

первая легкая цепь содержит [VL1]-[линкер 2]-[цепь обскурин-подобный-O] в порядке от N-конца к С-концу;

вторая тяжелая цепь содержит [VH2]-[CH1]-[Fc2] в порядке от N-конца к С-концу, и вторая легкая цепь содержит [VL2]-[CL] в порядке от N-конца к С-концу; или

b. первая тяжелая цепь содержит [VH1]-[линкер 1]-[цепь обскурин-подобный-O]-[Fc1] в порядке от N-конца к С-концу,

первая легкая цепь содержит [VL1]-[линкер 2]-[цепь титин-T] в порядке от N-конца к С-концу,

вторая тяжелая цепь содержит [VH2]-[CH1]-[Fc2] в порядке от N-конца к С-концу, и вторая легкая цепь содержит [VL2]-[CL] в порядке от N-конца к С-концу;

где линкер 1 и линкер 2 являются идентичными или различными; в некоторых вариантах осуществления каждая из Fc1 и Fc2 независимо содержит одну или более аминокислотных замен, которые снижают гомодимеризацию; в некоторых вариантах осуществления предложены линкер 1 и линкер 2, где: А) линкер 1 и линкер 2 оба представляют собой линкеры  $(G_xS)_y$ , где x выбран из группы, состоящей из целых чисел от 1 до 5 (например, 1, 2, 3, 4 или 5), и y выбран из группы, состоящей из целых чисел от 0 до 6 (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6) (где: когда y равен 0, линкер представляет собой связь); или В) линкер 1 представляет собой С-концевую усеченную последовательность CH1, и линкер 2 представляет собой С-концевую усеченную последовательность CL; в некоторых вариантах осуществления линкер 1 и линкер 2 выбраны из любого из А)-С): А) линкер 1, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 173; и линкер 2, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 174; В) линкер 1 и линкер 2, оба из которых имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 175; и С) линкер 1 и линкер 2, оба из которых имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 176. В некоторых вариантах осуществления Fc1 имеет структуру выступа в соответствии с методом «выступ-во-впадину», и Fc2 имеет структуру впадины в соответствии с методом «выступ-во-впадину», или Fc1 имеет структуру впадины в соответствии с методом «выступ-во-впадину», и Fc2 имеет структуру выступа в соответствии с методом «выступ-во-впадину». В некоторых вариантах осуществления Fc1 содержит одну или более аминокислотных замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из 354, 356, 358 и 366, и Fc2 содержит одну или более аминокислотных замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из 349, 356, 358, 366, 368 и 407. В некоторых вариантах осуществления Fc2 содержит одну или более аминокислотных замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из 354, 356, 358 и 366, и Fc1 содержит одну или более аминокислотных замен в

положениях, выбранных из группы, состоящей из 349, 356, 358, 366, 368 и 407. В некоторых вариантах осуществления Fc1 содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из 354C, 356E, 358M и 366W, и Fc2 содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из 349C, 356E, 358M, 366S, 368A и 407V. В некоторых вариантах осуществления Fc2 содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из 354C, 356E, 358M и 366W, и Fc1 содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из 349C, 356E, 358M, 366S, 368A и 407V. В некоторых вариантах осуществления Fc1 содержит аминокислотные замены 354C, 356E, 358M и 366W, и Fc2 содержит аминокислотные замены 349C, 356E, 358M, 366S, 368A и 407V. В некоторых вариантах осуществления Fc2 содержит аминокислотные замены 354C, 356E, 358M и 366W, и Fc1 содержит аминокислотные замены 349C, 356E, 358M, 366S, 368A и 407V. В некоторых вариантах осуществления Fc1 представлен в SEQ ID NO: 177, и Fc2 представлен в SEQ ID NO: 178; или Fc2 представлен в SEQ ID NO: 177, и Fc1 представлен в SEQ ID NO: 178.

#### Модификация области Fc

В одном аспекте область Fc согласно настоящему изобретению содержит одну или более аминокислотных замен, которые уменьшают ее связывание с Fc-рецептором, например, ее связывание с Fcγ-рецептором, и уменьшают или устраняют эффекторную функцию. Нативная область Fc IgG, в частности, область Fc IgG1 или область Fc IgG4, может вызывать нацеливание слитого белка по настоящему изобретению на клетки, экспрессирующие Fc-рецептор, а не на клетки, экспрессирующие антиген. В некоторых вариантах осуществления модифицированная область Fc согласно настоящему изобретению демонстрирует сниженную аффинность связывания с Fc-рецептором и/или сниженные эффекторные функции. В некоторых вариантах осуществления модифицированная область Fc демонстрирует более чем 50%, 80%, 90% или 95% снижение аффинности связывания с Fc-рецептором по сравнению с нативной областью Fc. В некоторых вариантах осуществления Fc-рецептор представляет собой Fcγ-рецептор. В некоторых вариантах осуществления Fc-рецептор представляет собой Fcγ-рецептор человека, например, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb или FcγRIIIa. В некоторых вариантах осуществления модифицированная область Fc также имеет сниженную аффинность связывания с комплементом (например, C1q) по сравнению с нативной областью Fc. В некоторых вариантах осуществления модифицированная область Fc не имеет сниженной аффинности связывания с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) по сравнению с нативной областью Fc. В некоторых вариантах осуществления модифицированная область Fc имеет

сниженные эффекторные функции, которые могут включать, но не ограничиваются, одно или более из следующего: сниженная комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC), сниженная антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), сниженный антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), сниженная секреция цитокинов, сниженное иммунокомплексное поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, сниженное связывание с NK-клетками, сниженное связывание с макрофагами, сниженное связывание с моноцитами, сниженное связывание с полиморфнонуклеарными клетками, сниженный апоптоз, индуцированный прямой сигнализацией, сниженное созревание дендритных клеток и сниженное праймирование Т-клеток. Для области Fc IgG1 замены аминокислотных остатков в положениях, таких как положения 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329, могут снижать эффекторные функции. В некоторых вариантах осуществления область Fc представляет собой область Fc IgG1 человека, и аминокислотные остатки в положениях 234 и 235 представляют собой А, как пронумеровано в соответствии с индексом EU. Для области Fc IgG4 замены аминокислотных остатков в положениях, таких как положение 228, могут снижать эффекторные функции.

Антигенсвязывающая молекула может содержать различные антигенсвязывающие домены, слитые с двумя субъединицами области Fc, и, таким образом, может привести к нежелательной гомодимеризации. Для повышения выхода и чистоты предпочтительно вводить модификации, которые способствуют гетеродимеризации в области Fc антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления область Fc по настоящему изобретению содержит модификации в соответствии с методом «выступ-во-впадину» (КИН), которая включает введение структуры выступа (выступ) на границе раздела первой субъединицы и структуры впадины (впадина) на границе раздела второй субъединицы; или структуры выступа (впадина) на границе раздела первой субъединицы и структуры впадины (выступ) на границе раздела второй субъединицы. Таким образом, структура выступа может быть расположена в структуре впадины, тем самым способствуя образованию гетеродимеров и ингибируя продукцию гомодимеров. Структуру выступа конструируют путем замены малой аминокислотной боковой цепи на границе раздела первой субъединицы более крупной боковой цепью (например, тирозином или триптофаном). Структуру впадины создают на границе раздела второй субъединицы путем замены большой аминокислотной боковой цепи меньшей аминокислотной боковой цепью (например, аланином или треонином). Структуры выступа и впадины получают путем изменения нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. В качестве иллюстрации, необязательные аминокислотные замены показаны в Таблице 2

ниже:

Таблица 2. Комбинация мутаций К1Н

Первая субъединица	T366Y	T366W	T394W	F405W	T366W	T366Y F405A	T366W F405W	F405W Y407A
Вторая субъединица	Y407T	Y407A	F405A	T394S	T366S L358A Y407V	T394W Y407T	T394W Y407A	T366W T394S

В дополнение к методу «выступ-во-впадину» в данной области техники также известны другие методики модификации домена СНЗ тяжелой цепи мультиспецифических антител для достижения гетеродимеризации, например, WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954 и WO 013/096291.

С-конец области Fc может представлять собой интактный С-конец, заканчивающийся аминокислотными остатками PGK, или усеченный С-конец, например, усеченный С-конец, в котором удалены один или два С-концевых аминокислотных остатка. В предпочтительном аспекте С-конец тяжелой цепи представляет собой укороченный С-конец, заканчивающийся PG. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления состав интактных антител может содержать популяции антител с удаленными всеми остатками K447 и/или G446 + K447. В некоторых вариантах осуществления состав интактных антител может содержать популяции антител без остатка K447 и/или удаленных остатков G446 + K447. В некоторых вариантах осуществления композиция интактных антител содержит популяции антител, содержащие смесь антител с остатком K447 и/или G446 + K447 и без них.

#### Способ рекомбинации

Антигенсвязывающая молекула или полипептид могут быть получены с использованием способов рекомбинации. Для этих способов предложены одна или более выделенных нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид или антигенсвязывающую молекулу.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид или антигенсвязывающую молекулу, описанные выше. Каждая из таких нуклеиновых кислот может независимо кодировать любую из полипептидных цепей, описанных выше. В другом аспекте настоящее изобретение относится к одному или более векторам (например, векторам экспрессии),



содержащим такие нуклеиновые кислоты. В другом аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей такие нуклеиновые кислоты. В одном варианте осуществления предложен способ получения полипептида или антигенсвязывающей молекулы, который включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид или антигенсвязывающую молекулу, как указано выше, в условиях, подходящих для экспрессии, и необязательно выделение антитела из клетки-хозяина (или среды клетки-хозяина).

Для рекомбинантной продукции полипептида или антигенсвязывающей молекулы нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, выделяют и встраивают в один или более векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такие нуклеиновые кислоты могут быть легко выделены и секвенированы с использованием обычных способов или получены способами рекомбинации или получены химическим синтезом.

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии вектора, кодирующего полипептид или антигенсвязывающий белок, включают прокариотические или эукариотические клетки, описанные в настоящем документе. Например, полипептид или антигенсвязывающая молекула могут быть получены в бактерии, в частности, когда гликозилирование и эффекторные функции Fc не требуются. После экспрессии полипептид или антигенсвязывающая молекула может быть выделена из бактериальной клеточной пасты в растворимой фракции и может быть дополнительно очищена.

Помимо прокариотов, эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы или дрожжи, являются подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антигенсвязывающие молекулы, включая штаммы грибов и дрожжей. Подходящие клетки-хозяева для экспрессии антигенсвязывающей молекулы также могут быть получены из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных); примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Был идентифицирован ряд штаммов бакуловирусов, которые могут быть использованы в комбинации с клетками насекомых, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*; культуры клеток растений также могут быть использованы в качестве хозяев, см., например, US 5959177, US 6040498, US 6420548, US 7125978 и US 6417429; клетки позвоночных также могут быть использованы в качестве хозяев, например, клеточные линии млекопитающих, адаптированные для роста в суспензии. Другие примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих включают линию почки обезьяны CV1, трансформированную SV40 (COS-7); линию эмбриональной почки человека (клетки 293 или 293T); клетки почки детеныша хомяка (ВНК); клетки сертоли мыши (клетки ТМ4); клетки почки обезьяны (CV1); клетки

почки африканской зеленой обезьяны (VERO-76); клетки рака шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени крысы-буффало (BRL3A); клетки легких человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI; клетки MRC5 и клетки FS4. Другие подходящие линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая клетки DHFR-CHO; и линии клеток миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Обзор некоторых линий клеток-хозяев млекопитающих, пригодных для продукции антител, см., например, в Yazaki, P. and Wu, A.M., *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (eds.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268.

### Анализ

Полипептид или антигенсвязывающая молекула, предложенные в настоящем документе, могут быть идентифицированы, подвергнуты скринингу или охарактеризованы с точки зрения их физических/химических характеристик и/или биологической активности с помощью различных анализов, известных в данной области техники. В одном аспекте полипептид или антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению тестируют на активность, например, с помощью известных способов, таких как ELISA, вестерн-блоттинг и тому подобное.

### Способ лечения и способ введения

Любая из антигенсвязывающих молекул, предложенных в настоящем документе, может быть использована в способе лечения. В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению антигенсвязывающей молекулы при изготовлении или получении лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления, в одном из таких вариантов осуществления, применение дополнительно включает введение субъекту эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента (например, одного, двух, трех, четырех, пяти или шести дополнительных терапевтических агентов). «Субъект» в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления может представлять собой человека.

В еще одном аспекте предложена фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающую молекулу, например, для любого из вышеуказанных фармацевтических применений или способов лечения. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит любую из антигенсвязывающих молекул, предложенных в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит

по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент.

Антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению может быть использована отдельно или в комбинации с другими агентами для лечения. Например, антитело по настоящему изобретению можно вводить совместно с по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим агентом.

Антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению (и любые дополнительные терапевтические агенты) может быть введена любым подходящим способом, включая парентеральное, внутрилегочное и интраназальное введение, и, если требуется при местном лечении, внутриочаговое введение. Парентеральная инфузия включает внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Введение может быть осуществлено любым подходящим способом, например, путем инъекции, такой как внутривенная или подкожная инъекция, в зависимости от того, является ли введение краткосрочным или долгосрочным. В настоящем документе рассматриваются различные схемы введения, включая, но не ограничиваясь, однократное введение или многократное введение в несколько моментов времени, болюсное введение и импульсную инфузию.

Антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению будет составлена, введена и применена в соответствии с надлежащей медицинской практикой. Факторы, рассматриваемые в этом контексте, включают конкретное состояние, подлежащее лечению, конкретное вскармливающее, подлежащее лечению, клиническое состояние отдельного пациента, причину состояния, место доставки агента, способ введения, время введения и другие факторы, известные практикующим врачам. Полипептид или слитый белок может быть составлен с одним или более агентами, применяемыми в настоящее время для предотвращения или лечения состояния, или без них. Эффективное количество таких дополнительных агентов зависит от количества, присутствующего в фармацевтической композиции, типа состояния или лечения и других факторов. Как правило их применяют в такой же дозировке и посредством того же способа введения, как описано в настоящем документе, или в дозировке, составляющей от около 1 до 99 % дозировки, описанной в настоящем документе, или в другой дозировке и посредством любого способа введения, эмпирически/клинически считающегося подходящим.

Для предотвращения или лечения заболевания подходящая дозировка антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению (при использовании отдельно или в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами) будет зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа терапевтической молекулы, тяжести и течения заболевания, цели введения (профилактическое или терапевтическое),

предыдущего лечения, клинического анамнеза и ответа на терапевтическую молекулу пациента и усмотрения лечащего врача. Терапевтическую молекулу подходящим образом вводят пациенту в ходе одной или серии процедур.

#### Изделие

В другом аспекте настоящего изобретения предложено изделие, которое содержит материалы, пригодные для лечения, предотвращения и/или диагностики вышеуказанного состояния. Изделие включает контейнер и этикетку или вкладыш в упаковку, находящийся на контейнере или связанный с ним. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы, пакеты с раствором для внутривенного введения и тому подобное. Контейнер может быть изготовлен из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит композицию, эффективную при лечении, предотвращении и/или диагностике заболевания, отдельно или в комбинации с другой композицией, и может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного введения раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций). По меньшей мере один активный агент в композиции представляет собой антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению. На этикетке или вкладыше в упаковку указано, что композиция используется для лечения выбранного состояния. Кроме того, изделие может содержать: (а) первый контейнер, содержащий композицию, где композиция содержит антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению; и (b) второй контейнер, содержащий композицию, где композиция содержит другие цитотоксические агенты или дополнительные терапевтические агенты. Изделие в этом варианте осуществления настоящего изобретения может дополнительно содержать вкладыш в упаковку, указывающий, что композиция может быть использована для лечения конкретного состояния. Альтернативно или дополнительно, изделие может дополнительно содержать второй (или третий) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер. С коммерческой и пользовательской точки зрения оно может дополнительно содержать другие материалы по мере необходимости, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Хотя антитела, используемые в примерах, нацелены на специфические антигены, специалистам в данной области техники, в свете раскрытия настоящего изобретения, будет понятно, что технический эффект достигается независимо от конкретных последовательностей CDR и независимо от конкретных последовательностей антигена, но с преимуществом замены цепи титин-Т/цепи обскурин-О или цепи титин-Т/ цепи обскурин-подобный-О в случае CH1/CL для уменьшения неправильного спаривания между

тяжелыми/легкими цепями.

#### Примеры и тестовые примеры

Настоящее изобретение дополнительно описано ниже со ссылкой на следующие примеры и тестовые примеры, которые, однако, не ограничивают настоящее изобретение. Экспериментальные способы в примерах и тестовых примерах по настоящему изобретению, в которых конкретные условия не указаны, обычно выполняют в обычных условиях, таких как *Antibodies: A Laboratory Manual* и *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* от Cold Spring Harbor Laboratory, или в условиях, рекомендованных производителями исходных материалов или коммерческих продуктов. Реагенты без указания конкретного происхождения являются коммерчески доступными общепринятыми реагентами.

#### Пример 1: Способ получения антитела или полипептидного белка

Способ включает: конструирование праймеров для конструирования фрагментов гена (например, фрагментов гена VH/VK антитела) с помощью ПЦР, подвергание фрагментов гена гомологичной рекомбинации с вектором экспрессии (таким как pHr (с сигнальным пептидом и фрагментом гена константной области (таким как CH1-Fc/CL)) для конструирования вектора экспрессии (такого как VH-CH1-Fc-pHr/VK-CL-pHr), введение сконструированного вектора экспрессии в прокариот или эукариот для экспрессии и, наконец, очистку продукта для получения желаемых антител или полипептидного белка. Без ограничения, константные области антитела могут быть выбраны из группы, состоящей из константных областей легкой цепи  $\kappa$ - и  $\lambda$ -цепей человека и константных областей тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Неограничивающие примеры дополнительно включают оптимизацию конструкции константных областей человеческого антитела, такую как мутации в положениях L234A/L235A или L234F/L235E константной области тяжелой цепи. В качестве примера, последовательности константной области легкой/тяжелой цепи антитела являются следующими:

> константная область тяжелой цепи IgG1 (сокращенно hIgG1):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC  
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY  
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA  
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN  
*GQPENNYKTTTPVLDSGDFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYTQKS*  
*LSLSPGK* (SEQ ID NO: 1).

Примечание: В последовательности сплошная подчеркнутая часть обозначает CH1, точечная подчеркнутая часть обозначает CH2, и курсивная часть обозначает CH3.

> константная область тяжелой цепи выступ-IgG1 (сокращенно выступ-IgG1):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC  
PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY  
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA  
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES  
*NGQPENNYKTTTPVLDSGDFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYTQK*  
*LSLSPGK* (SEQ ID NO:2).

Примечание: В последовательности сплошная подчеркнутая часть обозначает CH1, точечная подчеркнутая часть обозначает CH2, и курсивная часть обозначает CH3.

> константная область тяжелой цепи впадина-IgG1 (сокращенно впадина-IgG1):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC  
PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY  
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA  
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN  
*GQPENNYKTTTPVLDSGDFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYTQKS*  
*LSLSPGK* (SEQ ID NO: 3).

Примечание: В последовательности сплошная подчеркнутая часть обозначает CH1, точечная подчеркнутая часть обозначает CH2, и курсивная часть обозначает CH3.

> константная область легкой цепи каппа (сокращенно каппа или hκ):

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ  
DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 4).

константная область легкой цепи лямбда (сокращенно lambda или hλ):

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSK  
QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSQRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 5).

> аминокислотная последовательность части Fc константной области тяжелой цепи

впадина-IgG1:

DKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK  
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA  
 VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHN  
 HYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 177).

> аминокислотная последовательность части Fc константной области тяжелой цепи  
 выступ-IgG1:

DKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK  
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA  
 VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHN  
 HYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 178).

> аминокислотная последовательность части CH1 константной области тяжелой  
 цепи IgG1:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKKVEPKSC (SEQ ID  
 NO: 179).

Аминокислотные последовательности переменных областей легкой и тяжелой  
 цепи антител к антигенам, таким как B7H3 и CD3, упомянутые в примерах или тестовых  
 примерах настоящего изобретения, являются следующими:

> аминокислотная последовательность VH антитела F0:

QVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNK  
 YYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSARLYASFDYWGQALVT  
 VSS (SEQ ID NO: 6).

> аминокислотная последовательность VL антитела F0:

DTVVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIYNTNTRSSGV  
 PDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESYYCAIHVDRDIWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:  
 7).

> аминокислотная последовательность VH антитела N0:

DVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTSSLSWMSWLRQAPGKGLEWVANINQDGSEK  
 NYVDSVKGRFTISRDNANSLYLQMSSLRAEDTAVYYCARGLWTFDSWGQGTLLTVSP  
 (SEQ ID NO: 8).

> аминокислотная последовательность VL антитела N0:

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQNNRFLAWYQQRPGQAPRLLIYAASSRATGVDP  
RFSGSGSGTDFTLTISRLEAEDFAMYHCQQYGSFPRTFGQGMVDIK (SEQ ID NO: 9).

> аминокислотная последовательность VH антитела S0:

EVQLQESGPGLVKPGGSLSLSCAASGFVFSYDMSWVRQTPERGLEWVAYISSGGGITYA  
PSTVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSLTSEDVAVYYCAAHYFGSSGPFAYWGQGLVTVS  
S (SEQ ID NO: 10).

> аминокислотная последовательность VL антитела S0:

DIQMTQSPASLSASVGRVTITCRASENIFSYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTRTLAEGVPS  
RFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQHNYGTPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 11).

> аминокислотная последовательность VH антитела V0:

QVQLQQAELARPGASVKMSCKASGYSFTSYTIHWVKQRPGQGLEWIGYINPNSRNT  
DYNQKFKDETTLTADRSSSTAYMQLISLTSEDSAVYYCARYSGSTPYWYFDVWGAGTTV  
TVSS (SEQ ID NO: 12).

> аминокислотная последовательность VL антитела V0:

QIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPAR  
FSVSVSGTSHSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 13).

> аминокислотная последовательность VH антитела J0:

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMHWVRQAPGKGLEWVGHISKTDA  
GTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAREIYYYAFDSWGQGLTV  
TVSS (SEQ ID NO: 14).

> аминокислотная последовательность VL антитела J0:

SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGSKYVHWYQQKPGQAPVLVIYGDNERPSGIPER  
FSGSNSGNTATLTISRAGDEADYYCQAADWVDFYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 15).

> аминокислотная последовательность VH антитела H0:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYMAWVRQAPGKGLEWVTSISYEGDITY  
YGDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCASQTLRESFDYWGQGLVTVSS  
(SEQ ID NO: 16).

> аминокислотная последовательность VL антитела H0:

DIQMTQSPSSVSASVGRVTITCRASQDIANYLSWYQQKPGKSPKLLIYGTSNLEVGVPS  
RFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDKEFPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 17).

> аминокислотная последовательность VH антитела R0:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLSLTSNSVNWIRQAPGKGLEWVGLIWSNGDITY  
NSAIKSRFTISRDTSKSTVYLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREYYGYFDYWGQGLVTVSS  
(SEQ ID NO: 18).

> аминокислотная последовательность VL антитела R0:



DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICLASEGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYGANSLQTGVPS  
RFSGSGSATDYTLTISSLQPEDFATYYCQQSYKFPNTFGQGTKVEVK (SEQ ID NO: 19).

> аминокислотная последовательность VH антитела Bmab (сокращенно B0):

QVQLQQSGAEVKKPGSSVRVSCASGGTFNNNAINWVRQAPGQGLEWMGGIIPMFGTA  
KYSQNFQGRVAITADESTGTASMESSLRSEDVAVYYCARSRDLLLPFHHSALSPWGRGT  
MVTVSS (SEQ ID NO: 20).

> аминокислотная последовательность VL антитела Bmab (сокращенно B0):

SSELTQDPAVSVALGQTVRVTCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLIYGKNNRPSGIPDR  
FSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCSSRDSSGNHWVFGGGTELTVL (SEQ ID NO: 21).

> аминокислотная последовательность VH антитела Umab (сокращенно U0):

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWLGWVRQMPGKGLDWIGIMSPVDSDIR  
YSPSFQGGVMTMSVDKSITAYLQWNSLKASDTAMYYCARRRPGQGYFDWFGQGLTVT  
SS (SEQ ID NO: 22).

> аминокислотная последовательность VL антитела Umab (сокращенно U0):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSR  
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNIYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 23).

> аминокислотная последовательность VH антитела Dmab (сокращенно D0):

EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTY  
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGLT  
VTVSS (SEQ ID NO: 24).

> аминокислотная последовательность VL антитела Dmab (сокращенно D0):

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIPD  
RFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVFCQQYGSSPRTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 25).

> аминокислотная последовательность VH антитела Tmab (сокращенно I0):

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIWDGTTDYN  
SAVKSRTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFDYWGQGLTVT  
SS (SEQ ID NO: 26).

> аминокислотная последовательность VL антитела Tmab (сокращенно I0):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPS  
RFSGSGSGTDFTFITISLQPEDFATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 27).

> аминокислотная последовательность VH антитела C0:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFDTYHMNWVRQAPGQRLEWMGDINPDIGG  
TSYNQNFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARWDFDSFANWGQGLTVTS  
S (SEQ ID NO: 28).

> аминокислотная последовательность VL антитела C0:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVSIIGTNLHWYQQKPGQPPKLLIYHASNLETG  
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCLQSRKIPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 29).

> аминокислотная последовательность VH антитела A0:

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNY  
ATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNEYISYWAYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 105).

> аминокислотная последовательность VL антитела A0:

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPG  
TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:  
106).

Последовательности константной области тяжелой цепи антител F0, N0, S0, V0, J0, H0, R0, B0, U0, D0, I0, C0 и A0, описанных выше, представляют собой константные области тяжелой цепи IgG1 (SEQ ID NO: 1), а последовательности константной области легкой цепи антител N0, S0, H0, R0, U0, I0 и C0 представляют собой константные области легкой цепи каппа (SEQ ID NO: 4); последовательности константной области легкой цепи антител F0, V0, J0, B0, D0 и A0 представляют собой константные области легкой цепи лямбда (SEQ ID NO: 5).

Кроме того, последовательность белка-антигена hB7H3 является следующей:

LEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSA  
YANRTALFPDLLAQGNASRLRQRVVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMT  
LEPNKDLRPGDVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSI  
LRVVLGANGTYSCVLRNPVLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATL  
RCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLR  
LQRVVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYR  
GYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCVLRNPV  
LQQDAHGSVTITQPMT DYKDDDDKHHHHHH (SEQ ID NO: 111).

Белок-антиген hCD3 представляет собой гетеродимер, состоящий из  $\delta$ -субъединицы и  $\epsilon$ -субъединицы антигена hCD3, где последовательность  $\delta$ -субъединицы антигена hCD3 является следующей:

FKIPIEELEDRVFNVCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKE  
STVQVHYRMCQSCVELDPATVASAENAQCEKELQALEKENAQLEWELQALEKELAQDY  
KDDDDK (SEQ ID NO: 112);

последовательность  $\epsilon$ -субъединицы антигена hCD3 выглядит следующим образом:

DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHL  
SLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDAKNAQCKKKLQAL

KKKNAQLKWKLQALKKKLAQNNNNNNH (SEQ ID NO: 113).

Пример 2: Замена домена CH1/CL антитела

Домен CH1/CL антитела заменяли на Ig-подобный домен, обладающий естественными межмолекулярными взаимодействиями в каждом из природного комплекса титин/обскурин, комплекса титин/обскурин-подобный O и комплекса IL6Ra/IL6Rb, для получения антител с модифицированным доменом CH1/CL.

В комплексе IL6Ra/IL6Rb Ig-подобный домен в белке IL6Ra для замены CH1 или CL антитела представляет собой цепь IL6Ra.0, и Ig-подобный домен в белке IL6Rb для замены CL или CH1 антитела представляет собой цепь IL6Rb.0; в комплексе титин/обскурин Ig-подобный домен (Ig-подобный домен титина 152) в белке титин для замены CH1 или CL антитела представляет собой цепь T.0, и Ig-подобный домен (Ig-подобный домен обскурина 1) в белке обскурин для замены CL или CH1 антитела представляет собой цепь O.0; в комплексе титин/обскурин-подобный-O Ig-подобный домен (Ig-подобный домен обскурин-подобного 1) в обскурин-подобном белке для замены CH1 или CL антитела представляет собой цепь OL.0, и Ig-подобный домен (Ig-подобный домен титина 152) в белке титин для замены CL или CH1 антитела представляет собой цепь T.0, где:

> последовательность цепи IL6Ra.0 представляет собой:

GILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWNSSFYRLRFELRYRAERSKTFTTWMV  
KDLQHNHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEFGQGEWSEWSPEAMGTPW (SEQ ID NO: 30);

> последовательность цепи IL6Rb.0 представляет собой:

FDPVYKVKPNPPHNLSVINSEELSSILKLTWTNPSIKSVIILKYNIQYRTKDASTWSQIPPE  
DTASTRSSFTVQDLKPFTEYVFRIRCMKEDGKGYWSDWSEEASGIT (SEQ ID NO: 31);

> последовательность цепи T.0 представляет собой:

GIPPKIEALPSDISIDEGKVLTVACAFTGEPTPEVTWSCGGRKIHSQEQRFHIENTDDLTT  
LIIMDVQKQDGGLYTSLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 32);

> последовательность цепи O.0 представляет собой:

SGAPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSCQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARFRLAQDGDLY  
RLTILDALGDSGQYVCRARNAIGEAFAAVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 33);

> последовательность цепи OL.0 представляет собой:

QGSPPCFLRFPRPVRVVSAGAEAEKCVVLGEPVPPVWVEKGGQQLAASERLSFPADGAE  
HGLLLTAALPTDAGVYVCRARNAAGEAYAAA AVTVLEPP (SEQ ID NO: 34).

Было сконструировано множество антител, в которых заменен CH1/CL, и проанализирована чистота антител и связывающая активность антител в отношении соответствующих антигенов (см. Тестовые примеры 2 и 4 настоящего изобретения для

способа анализа). Экспериментальные результаты показаны в Таблице 3 ниже. Экспериментальные результаты показали, что после того, как домены CH1/CL антител, таких как F0, V0, S0, N0, J0, H0, R0 и C0, которые связывались с различными антигенами, были одновременно заменены цепью T.0/цепью O.0 или цепью T.0/цепью OL.0, антитела все еще сохраняли хорошую связывающую активность и имели высокую чистоту.

Таблица 3. Результаты анализа чистоты и связывания антигена для антител

Название антитела		CH1/CL и пептиды, заменяющие их		Чистота антитела SEC (%)	Анализ связывания антигена EC50 (нМ)
		CH1	CL		
Серия F0	F0	CH1	CL	98	1,29
	F1	IL6Rb.0	IL6Ra.0	47	71,6
	F2	IL6Ra.0	IL6Rb.0	67	59,28
	F3	T.0	O.0	100	2,83
	F4	T.0	OL.0	100	2,17
Серия V0	V0	CH1	CL	86	1,8
	V1	IL6Rb.0	IL6Ra.0	38	38,4
	V2	IL6Ra.0	IL6Rb.0	нет данных	-
	V3	T.0	O.0	99	3,6
	V4	T.0	OL.0	97	2,9
	V5	O.0	T.0	98	3,2
	V6	OL.0	T.0	97	4,7
Серия S0	S0	CH1	CL	97	1,01
	S1	IL6Rb.0	IL6Ra.0	нет данных	-
	S2	IL6Ra.0	IL6Rb.0	нет данных	-
	S3	T.0	OL.0	83	3,5
	S4	OL.0	T.0	90	1,96
Серия N0	N0	CH1	CL	99	0,82
	N1	IL6Rb.0	IL6Ra.0	100	1229
	N2	IL6Ra.0	IL6Rb.0	67	766,5
	N3	T.0	O.0	90	6,45
	N4	T.0	OL.0	83	5,93

	N5	O.0	T.0	90	5,24
Серия J0	J0	CH1	CL	95	0,08
	J1	IL6Rb.0	IL6Ra.0	нет данных	-
	J2	IL6Ra.0	IL6Rb.0	нет данных	179
	J3	OL.0	T.0	93	0,25
Серия H0	H0	CH1	CL	нет данных	1,74
	H1	IL6Rb.0	IL6Ra.0	75	19,35
	H2	IL6Ra.0	IL6Rb.0	80	24,38
	H3	T.0	O.0	95	2,753
	H4	T.0	OL.0	95	2,702
Серия R0	R0	CH1	CL	нет данных	1,75
	R1	IL6Rb.0	IL6Ra.0	75	24,45
	R2	IL6Ra.0	IL6Rb.0	60	18,4
	R3	O.0	T.0	98	1,576
	R4	OL.0	T.0	98	1,667
	R5	T.0	O.0	98	1,589
	R6	T.0	OL.0	97	2,016
Серия C0	C0	CH1	CL	96	5,81
	C1	O.0	T.0	95	17,7
	C2	OL.0	T.0	99	16,48

Примечание: Например, F1 указывает на антитело, полученное путем замены CH1 тяжелой цепи антитела F0 на цепь IL6Rb.0 (SEQ ID NO: 31) и замены CL легкой цепи на цепь IL6Ra.0 (SEQ ID NO: 30), при этом другие части оставались такими же, как и у F0, и так далее для других. В таблице «-» указывает на отсутствие обнаружения, и SEC указывает на чистоту антитела, определенную с помощью эксклюзионной хроматографии («нет данных» указывает на отсутствие обнаружения из-за недостаточной экспрессии).

Пример 3: Оптимизация конструкции антитела с модифицированным доменом CH1/CL

I. Мутации на отдельных аминокислотных остатках Ig-подобного домена титина 152 (цепь T.0), Ig-подобного домена обскурина 1 (цепь O.0) и Ig-подобного домена обскурина-подобного 1 (цепь OL.0)

В качестве иллюстрации, во-первых, аминокислотные остатки в цепи T.0, цепи O.0 и цепи OL.0 были мутированы для увеличения межцепочечных дисульфидных связей; во-вторых, другие отдельные аминокислоты в доменах также были мутированы, например, аминокислоты в положениях 7, 62 и 11 Ig-подобного домена обскурина 1 были мутированы; 5 аминокислот «KAGIR (SEQ ID NO: 180)» в 5 белках титин дикого типа, которые непосредственно примыкают к N-концу Ig-подобного домена титина 152, были добавлены к N-концу Ig-подобного домена титина 152; 5 аминокислот «DQPQF (SEQ ID NO: 181)» в 5 белках обскурина дикого типа, которые непосредственно примыкают к N-концу Ig-подобного домена обскурина 1, были добавлены к N-концу Ig-подобного домена обскурина 1. Конкретная оптимизация конструкции домена показана в Таблицах от 4-1 до 4-3.

Таблица 4-1. Аминокислотные мутации в цепи T.0

Цепь титин-T	
Название	Тип мутации
T.0	Дикий тип (SEQ ID NO: 32)
T.1	C25S, C39T, A8C
T.2	C25S, C39T, V20C
T.3	C25S, C39T, A26C
T.4	C25S, C39T, T22C
T.5	C25S, C39T, A8C, N-конец + титин_KAGIR
T.6	N-конец + титин_KAGIR

Примечание: В таблице, например, тип мутации «C25S, C39T, A8C» для T.1 указывает, что аминокислотный остаток в положении 25 последовательности T.0 (SEQ ID NO: 32) был мутирован из С в S, аминокислотный остаток в положении 39 был мутирован из С в Т, и аминокислотный остаток в положении 8 был мутирован из С в А; тип мутации «N-конец + титин\_KAGIR» для T.6 указывает, что 5 аминокислот «KAGIR» были добавлены к N-концу последовательности T.0 (SEQ ID NO: 32); и так далее для других.

Таблица 4-2. Аминокислотные мутации в цепи T.0

Название	Тип мутации
O.0	Дикий тип (SEQ ID NO: 33)
O.1	A88C
O.2	A3C
O.3	R9C
O.4	C25S, C76S, A88C
O.5	C25S, C76S, A3C
O.6	C25S, C76S, R9C

O.7	C25S, C76S, A88C, L7K, T62K
O.8	C25S, C76S, A88C, L7K, T62H
O.9	C25S, C76S, A88C, K11L, T62K
O.10	C25S, C76S, A88C, K11L, T62H
O.11	C25S, C76S, A88C, N-конец + обскурин_DQPQF
O.12	C25S, C76S, A88C, L7K, T62K, N-конец + обскурин_DQPQF
O.13	C25S, C76S, A88C, L7K, T62H, N-конец + обскурин_DQPQF
O.14	C25S, C76S, A88C, L7R, T62K, N-конец + обскурин_DQPQF
O.15	C25S, C76S, A88C, L7R, T62H, N-конец + обскурин_DQPQF
O.16	N-конец + обскурин_DQPQF

Примечание: В таблице тип мутации «A88C» для O.1 указывает на то, что аминокислотный остаток в положении 88 последовательности O.0 (SEQ ID NO: 33) был мутирован из А в С; тип мутации «C25S, C76S, A88C, N-конец + обскурин\_DQPQF» для O.11 указывает на то, что последовательность O.0 (SEQ ID NO: 33) была подвергнута аминокислотным мутациям C25S, C76S и A88C, и 5 аминокислот «DQPQF» были добавлены на N-конце O.0; и так далее для других.

Таблица 4-3. Аминокислотные мутации в цепи OL.0

Цепь обскурин-подобный-О	
Название	Тип мутации
OL.0	Дикий тип (SEQ ID NO: 34)
OL.1	C6E, V74C
OL.2	C6E, G84C
OL.3	C6E, A86C
OL.4	C6E, C26S, C77S, V74C
OL.5	C6E, C26S, C77S, G84C
OL.6	C6E, C26S, C77S, A86C

Примечание: В таблице, например, тип мутации «C6E, V74C» для OL.1 указывает на то, что аминокислотный остаток в положении 6 последовательности OL.0 (SEQ ID NO: 34) был мутирован из С в Е, а аминокислотный остаток в положении 74 был мутирован из V в С; и так далее для других.

Последовательности цепи титин-Т, цепи обскурин-О и цепи обскурин-подобный-О после мутации являются следующими:

> T.1 (T.0 с мутациями C25S, C39T и A8C)

GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQRFHIENTDDLTTL  
IIMDVQKQDGGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 35);

> T.2 (T.0 с мутациями C25S, C39T и V20C)

GIPPKIEALPSDISIDEGKCLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQRFHIENTDDLTTL  
IIMDVQKQDGGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 36);

> T.3 (T.0 с мутациями C25S, C39T и A26C)

GIPPKIEALPSDISIDEGKVLTVASCFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQRFHIENTDDLTTL  
IIMDVQKQDGGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 37);

> T.4 (T.0 с мутациями C25S, C39T и T22C)

GIPPKIEALPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQRFHIENTDDLTT  
LIIMDVQKQDGGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 38);

> T.5 (T.0 с мутациями C25S, C39T и A8C; с добавлением KAGIR на N-конце)

KAGIRGIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQRFHIENT  
DDLTTLIIMDVQKQDGGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 39);

> T.6 (T.0 с добавлением KAGIR на N-конце)

KAGIRGIPPKIEALPSDISIDEGKVLTVACAFTGEPTPEVTWSCGGRKIHSQEQRFHIENT  
DDLTTLIIMDVQKQDGGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 127);

> T.1-L1 (T.0 с мутациями C25S, C39T и A8C; с линкером (G<sub>4</sub>S)<sub>1</sub>, добавленным на N-  
конце)

GGGGSGGIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQR  
FHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO:  
40);

> T.1-L2 (T.0 с мутациями C25S, C39T и A8C; с линкером (G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub>, добавленным на N-  
конце)

GGGGSGGGGSGGIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHS  
QEQRFHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ  
ID NO: 41);

> O.1 (O.0 с мутацией A88C)

SGAPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSCQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARFRLAQDGDLY  
RLTILDLALGDSGQYVCRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 42);

> O.2 (O.0 с мутацией A3C)

SGCPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSCQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARFRLAQDGDLY  
RLTILDLALGDSGQYVCRARNAIGFAAVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 43);

> O.3 (O.0 с мутацией R9C)

SGAPRFLTCRPAFVVSVGKDATLSCQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARFRLAQDGDLY



RLTILDLALGDSGQYVCRARNAIGEAFAAVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 44);

> O.4 (O.0 с мутациями C25S, C76S и A88C)

SGAPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARFRLAQDGDLY  
RLTILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 45);

> O.5 (O.0 с мутациями C25S, C76S и A3C)

SGCPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARFRLAQDGDLY  
RLTILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFAAVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 46);

> O.6 (O.0 с мутациями C25S, C76S и R9C)

SGAPRFLTCPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARFRLAQDGDLY  
RLTILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFAAVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 47);

> O.7 (O.0 с мутациями C25S, C76S, A88C, L7K и T62K)

SGAPRFKTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARFRLAQDGDLY  
RLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 48);

> O.8 (O.0 с мутациями C25S, C76S, A88C, L7K и T62H)

SGAPRFKTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARFRLAQDGDLY  
RLHILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 49);

> O.9 (O.0 с мутациями C25S, C76S, A88C, K11L и T62K)

SGAPRFLTRPLAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARFRLAQDGDLY  
RLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 50);

> O.10 (O.0 с мутациями C25S, C76S, A88C, K11L и T62H)

SGAPRFLTRPLAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARFRLAQDGDLY  
RLHILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 51);

> O.11 (O.0 с мутациями C25S, C76S и A88C; с добавлением DQPQF на N-конце)

DQPQFSGAPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARFRLAQ  
DGDLYRLTILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 52);

> O.12 (O.0 с мутациями C25S, C76S, A88C, L7K и T62K; с добавлением DQPQF на  
N-конце)

DQPQFSGAPRFKTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARFRLAQ  
DGDLYRLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 53);

> O.13 (O.0 с мутациями C25S, C76S, A88C, L7K и T62H; с добавлением DQPQF на  
N-конце)

DQPQFSGAPRFKTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARFRLAQ  
DGDLYRLHILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 54);

> O.14 (O.0 с мутациями C25S, C76S, A88C, L7R и T62K; с добавлением DQPQF на  
N-конце)

DQPQFSGAPRFRTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARFRLAQ  
DGDLYRLKILDALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 55);

> O.15 (O.0 с мутациями C25S, C76S, A88C, L7R и T62H; с добавлением DQPQF на N-конце)

DQPQFSGAPRFRTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARFRLAQ  
DGDLYRLHILDALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 56);

> O.16 (O.0 с добавлением DQPQF на N-конце)

DQPQFSGAPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSCQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARFRLAQ  
DGDLYRLTILDALGDSGQYVCRARNAIGEAFAAVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 128);

> O.4-L1 (O.0 с мутациями C25S, C76S и A88C; с линкером (G<sub>4</sub>S)<sub>1</sub>, добавленным на N-конце)

GGGGSSGAPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGA  
RFRLAQDGDLYRLTILDALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ  
ID NO: 57);

> O.4-L2 (O.0 с мутациями C25S, C76S и A88C; с линкером (G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub>, добавленным на N-конце)

GGGGSGGGGSSGAPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPV  
AAGARFRLAQDGDLYRLTILDALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA  
(SEQ ID NO: 58);

> OL.1 (OL.0 с мутациями C6E и V74C)

QGSPPEFLRFPRPVRVVS~~G~~AELKCVVLGEP~~P~~VVVWEKGGQQLAASERLSFPADGAE  
HGLLLTAALPTDAGCYVCRARNAAGEAYAAA~~A~~VTVLEPP (SEQ ID NO: 59);

> OL.2 (OL.0 с мутациями C6E и G84C)

QGSPPEFLRFPRPVRVVS~~G~~AELKCVVLGEP~~P~~VVVWEKGGQQLAASERLSFPADGAE  
HGLLLTAALPTDAGVYVCRARNAACEAYAAA~~A~~VTVLEPP (SEQ ID NO: 60);

> OL.3 (OL.0 с мутациями C6E и A86C)

QGSPPEFLRFPRPVRVVS~~G~~AELKCVVLGEP~~P~~VVVWEKGGQQLAASERLSFPADGAE  
HGLLLTAALPTDAGVYVCRARNAAGECYAAA~~A~~VTVLEPP (SEQ ID NO: 61);

> OL.4 (OL.0 с мутациями C6E, C26S, C77S и V74C)

QGSPPEFLRFPRPVRVVS~~G~~AELKSVVLGEP~~P~~VVVWEKGGQQLAASERLSFPADGAE  
HGLLLTAALPTDAGCYVSRARNAAGEAYAAA~~A~~VTVLEPP (SEQ ID NO: 62);

> OL.5 (OL.0 с мутациями C6E, C26S, C77S и G84C)

QGSPPEFLRFPRPVRVVS~~G~~AELKSVVLGEP~~P~~VVVWEKGGQQLAASERLSFPADGAE  
HGLLLTAALPTDAGVYVSRARNAACEAYAAA~~A~~VTVLEPP (SEQ ID NO: 63);

> OL.6 (OL.0 с мутациями C6E, C26S, C77S и A86C)

QGSPPEFLRFPRPVRVVS~~GA~~EAE~~LK~~SVVLGEP~~PP~~VVVWEKGGQQLAASERLSFPADGAE  
HGLLLTAALPTDAGVYVSRARNAAGECYAAAAVTVLEPP (SEQ ID NO: 64).

Примечание: В приведенных выше последовательностях двойная подчеркнутая часть указывает на линкерную последовательность.

Антитела, в которых заменен CH1/CL, конструировали с использованием цепи титин-Т, цепи обскурин-О и цепи обскурин-подобный-О, описанных выше (см. Таблицу 5 для конкретных замен), и связывающую активность каждого из мутантных антител после оптимизации в отношении соответствующего антигена анализировали с помощью способа тестового примера 4 по настоящему изобретению. Результаты эксперимента приведены в таблице 5. Результаты показали, что модифицированное антитело сохраняло хорошую антигенсвязывающую активность.

Таблица 5. Результаты анализа связывания антигена на антителах

Название антитела		Пептиды, заменяющие CH1/CL		Анализ связывания с соответствующим антигеном EC50 (нМ)
		CH1	CL	
Серия F0	F3	T.0	O.0	2,64
	F5	T.1	O.1	1,21
	F6	T.2	O.2	2,71
	F7	T.3	O.3	3,38
	F8	T.1	O.4	3,14
	F9	T.2	O.5	3,52
	F10	T.3	O.6	3,94
	F4	T.0	OL.0	3,01
	F11	T.1	OL.1	6,15
	F12	T.2	OL.2	8,19
	F13	T.4	OL.3	6,08
	F14	T.1	OL.4	5,15
	F15	T.2	OL.5	4,44
Серия H0	H3	T.0	O.0	3,24
	H5	T.1	O.1	3,40
	H6	T.2	O.2	2,10

	H7	T.3	O.3	2,70
	H8	T.1	O.4	2,11
	H9	T.2	O.5	2,92
	H10	T.3	O.6	2,86
	H4	T.0	OL.0	3,28
	H11	T.1	OL.1	3,38
	H12	T.2	OL.2	4,34
	H13	T.4	OL.3	3,56
	H14	T.1	OL.4	2,61
	H15	T.4	OL.6	4,26
Серия R0	R5	T.0	O.0	4,13
	R7	T.1	O.1	4,89
	R8	T.2	O.2	3,84
	R9	T.3	O.3	3,95
	R10	T.1	O.4	3,20
	R11	T.2	O.5	3,30
	R12	T.3	O.6	4,36
Серия N0	N3	T.0	O.0	4,5
	N6	T.2	O.5	8,4
	N4	T.0	OL.0	4,6
	N7	T.5	OL.1	2,8
	N8	T.5	OL.4	2,6

Примечание: Например, антитело «F5» в таблице указывает на антитело, полученное путем замены CH1 тяжелой цепи антитела F0 на цепь T.1 (SEQ ID NO: 35) и замены CL легкой цепи на цепь O.1 (SEQ ID NO: 42), при этом другие части являются такими же, как и у F0; и так далее для других.

Кроме того, антитела, в которых заменен CH1/CL, были сконструированы с использованием мутированной или домен-модифицированной цепи титин-Т и цепи обскурин-О, описанных выше, и функциональную активность других антител, в которых CH1/CL заменен, анализировали с помощью способов тестового примера 2 и тестового примера 4 по настоящему изобретению. Экспериментальные результаты приведены в

таблице 6. Экспериментальные результаты показали, что антитела, в которых CH1/CL заменен, все еще сохраняют хорошую антигенсвязывающую активность и имеют относительно высокую чистоту SEC (%).

Таблица 6. Результаты анализа чистоты и активности связывания антител с модифицированным доменом

Название антитела		Пептиды, заменяющие CH1/CL		Чистота антитела SEC (%)	Анализ связывания с соответствующим антигеном EC50 (нМ)
		CH1	CL		
Серия F0	F16	T.5	O.4	65	2,0
	F17	T.5	O.7	72	4,8
	F18	T.1	O.8	70	3,9
	F19	T.5	O.8	68	2,2
	F20	T.1	O.9	71	1,9
	F21	T.5	O.9	68	3,4
	F22	T.1	O.10	74	2,4
	F23	T.5	O.10	73	4,1
	F24	T.1	O.12	71	2,4
	F25	T.5	O.12	66	2,6
	F26	T.1	O.13	73	2,6
	F27	T.5	O.13	71	1,2
	F28	T.1	O.14	75	2,4
	F29	T.5	O.14	68	3,6
	F30	T.1	O.15	75	3,4
	F31	T.5	O.15	69	2,4
	F32	T.1-L1	O.4-L2	72	3,69
	F33	T.1-L2	O.4-L1	69	1,92
F34	T.1-L2	O.4-L2	73	2,38	
Серия N0	N10	T.5	O.4	89	3,0
	N11	T.1	O.7	86	5,0
	N12	T.1	O.8	84	5,3

	N13	T.5	O.8	82	2,9
	N14	T.1	O.9	92	1,9
	N15	T.5	O.9	92	2,6
	N16	T.5	O.10	91	3,4
	N17	T.1	O.11	90	2,2
	N18	T.5	O.11	89	3,2
	N19	T.1	O.12	84	4,3
	N20	T.5	O.12	84	2,8
	N21	T.5	O.13	84	5,2
	N22	T.5	O.14	87	4,5
	N23	T.1	O.15	86	9,4
	N24	T.5	O.15	84	6,7
	N25	T.1-L1	O.4-L2	92	0,62
	N26	T.1-L2	O.4-L1	93	0,84
	N27	T.1-L2	O.4-L2	94	0,67
Серия R0	R10	T.1	O.4	84	0,37
	R13	T.5	O.4	76	0,4
	R14	T.5	O.7	78	0,2
	R15	T.5	O.8	82	0,3
	R16	T.5	O.9	80	0,33
	R17	T.5	O.10	77	0,4
	R18	T.5	O.11	71	0,44
	R19	T.5	O.12	78	0,36
	R20	T.5	O.13	75	0,39
	R21	T.5	O.14	77	0,37
R22	T.5	O.15	74	0,39	

Примечание: Например, антитело «F16» в таблице указывает на антитело, полученное путем замены CH1 тяжелой цепи антитела F0 на цепь T.5 (SEQ ID NO: 39) и замены CL легкой цепи на цепь O.4 (SEQ ID NO: 45), при этом другие части остались такими же, как и у F0; и так далее для других.

II. Мутации в других аминокислотах Ig-подобного домена титина 152 и Ig-подобного домена обскурина 1

Конкретная конструкция для аминокислотных мутаций в Ig-подобном домене титина 152 и Ig-подобном домене обскурина 1 показана в таблице 7.

Таблица 7. Конструкция для аминокислотных мутаций в цепи Т.1/цепи О.9

Цепь титин-Т		Цепь обскурин-О	
Название	Тип мутации	Название	Тип мутации
T.1	T.1 (SEQ ID NO: 35)	O.9	O.9 (SEQ ID NO: 50)
T.7	T.1+ (M66S, T77S)	O.17	O.9+ (L11K, A12S, F13Y, V14T, T22S)
T.8	T.1+ (M66K, K70R, S79T, G81R)	O.18	O.9+ (G2E, V17E, N30D, T32P, Q34E, S36T, V44I, A45T, L58V, K62E, A67Q, G69S, A97G)
T.9	T.1+ (P3W, S11I, I13L, T22M, N82M)	O.19	O.9+ (D20L, T22M, A53L)
T.10	T.1+ (S11I, M66K, S79T, G81R)	O.20	O.9+ (Q41K, A45T, A67Q, G69S, V89L)
T.11	T.1+ (G40S, R42K, H45S, Q47E, Q49G, N56S, D58E, L75V, E83D, F84L)	O.21	O.9+ (Q42L, A45T, A67T, G69S, Q92E, D94G)
T.12	T.1+ (Q47E, Q49G, N56S, D58E, L75V)	O.22	O.9+ (A12S, F13Y, T22S, Q42L, A45T, A67Q, G69S, Q92E, D94G)
T.13	T.1+ (N56S, D58E, L75V)	O.23	O.9 + (A12S, F13Y, T22S, Q42L, A45T, A67Q, G69S, Q92E, D94G), N-конец + DQPQF
T.14	T.1+ (N56S, D58E, M66S, T77S)		
T.15	T.1 + (N56S, D58E, M66S, T77S), N-конец + KAGIR		

Примечание: В таблице, например, T.7 указывает на цепь титин-Т, полученную с использованием аминокислотных мутаций M66S и T77S в последовательности T.1 (SEQ ID NO: 35); O.23 указывает на цепь обскурин-О, полученную с использованием аминокислотных мутаций A12S, F13Y, T22S, Q42L, A45T, A67Q, G69S, Q92E и D94G в O.9 (SEQ ID NO: 50), с последующим добавлением последовательности «DQPQF» на N-конце,

и так далее для других.

Мутантные последовательности цепи Т.1 и цепи О.9 являются следующими:

> Т.7 (Т.1 с мутациями М66S и Т77S)

GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSEEQGRFHIENTDDLTTL  
IISDVQKQDGGGLYSLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 65);

> Т.8 (Т.1 с мутациями М66K, К70R, S79T и G81R)

GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSEEQGRFHIENTDDLTTL  
IKDVQRQDGGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 66);

> Т.9 (Т.1 с мутациями P3W, S11I, I13L, T22M и N82M)

GIWPKIECLPIDLSIDEGKVLTMVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSEEQGRFHIENTDDLTT  
TLIIMDVQKQDGGGLYTLSLGMEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 67);

> Т.10 (Т.1 с мутациями S11I, М66K, S79T и G81R)

GIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSEEQGRFHIENTDDLTTL  
IKDVQKQDGGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 68);

> Т.11 (Т.1 с мутациями G40S, R42K, H45S, Q47E, Q49G, N56S, D58E, L75V, E83D и  
F84L)

GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTSGKKISSEEGGRFHIESTEDLTTLI  
MDVQKQDGGVYTLSLGNDLGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 69);

> Т.12) (Т.1 с мутациями Q47E, Q49G, N56S, D58E и L75V)

GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSEEGGRFHIESTEDLTTLI  
IMDVQKQDGGVYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 70);

> Т.13 (Т.1 с мутациями N56S, D58E и L75V)

GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSEEQGRFHIESTEDLTTLI  
IMDVQKQDGGVYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 71);

> Т.14 (Т.1 с мутациями N56S, D58E, М66S и Т77S)

GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSEEQGRFHIESTEDLTTLI  
ISDVQKQDGGGLYSLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 72);

> Т.15 (Т.1 с мутациями N56S, D58E, М66S и Т77S, N-конец + KAGIR)

KAGIRGIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSEEQGRFHIESTE  
DLTTLIISDVQKQDGGGLYSLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 74);

> Т.10-L1 (Т.1 с мутациями S11I, М66K, S79T и G81R + (G<sub>4</sub>S)<sub>1</sub> линкерная  
последовательность)

GGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSEEQGRF  
HIENTDDLTTLIKDVQKQDGGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO:  
73);



> T.15-L1 (T.1 с мутациями N56S, D58E, M66S и T77S, N-конец + KAGIR, + (G<sub>4</sub>S)<sub>1</sub> линкерная последовательность)

GGGGSKAGIRGIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIH  
QEQGRFHIEDLTLTLLISDVQKQDGGGLYSLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ  
ID NO: 75);

> T.14-L1 (T.1 с мутациями N56S, D58E, M66S и T77S + (G<sub>4</sub>S)<sub>1</sub> линкерная последовательность)

GGGGSGIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIH  
SQQEGRFHIEDLTLTLLISDVQKQDGGGLYSLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO:  
76);

> O.17 (O.9 с мутациями L11K, A12S, F13Y, V14T и T22S)

SGAPRFLTRPKSYTVSVGKDASLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARFRLAQDGDLY  
RLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 77);

> O.18 (O.9 с мутациями G2E, V17E, N30D, T32P, Q34E, S36T, V44I, A45T, L58V,  
K62E, A67Q, G69S и A97G)

SEAPRFLTRPLAFVVSEGKDATLSSQIVGDPPEVTWEKDQQPITAGARFRLAQDGDVYR  
LEILDQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEG (SEQ ID NO: 78);

> O.19 (O.9 с мутациями D20L, T22M и A53L)

SGAPRFLTRPLAFVVSVGKLAAMLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARFRLAQDGDLY  
RLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 79);

> O.20 (O.9 с мутациями Q41K, A45T, A67Q, G69S и V89L)

SGAPRFLTRPLAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDKQPVTAGARFRLAQDGDLY  
RLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 80);

> O.21 (O.9 с мутациями Q42L, A45T, A67T, G69S, Q92E и D94G)

SGAPRFLTRPLAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQLPVTAGARFRLAQDGDLY  
RLKILDLTSLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 81);

> O.22 (O.9 с мутациями A12S, F13Y, T22S, Q42L, A45T, A67Q, G69S, Q92E и D94G)

SGAPRFLTRPLSYVVSVGKDASLSSQIVGNPTPQVSWEKDQLPVTAGARFRLAQDGDLY  
RLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 82);

> O.23 (O.9 с мутациями A12S, F13Y, T22S, Q42L, A45T, A67Q, G69S, Q92E и D94G,  
N-конец + DQPQF)

DQPQFSGAPRFLTRPLSYVVSVGKDASLSSQIVGNPTPQVSWEKDQLPVTAGARFRLA  
QDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 85);

> O.20-L1 (O.9 с мутациями Q41K, A45T, A67Q, G69S и V89L + (G<sub>4</sub>S)<sub>1</sub> линкерная последовательность)

GGGGSSGAPRFLTRPLAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDKQPVTAGAR  
FRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACGLQVDAEA (SEQ ID  
NO: 83);

> O.22-L1 (O.9 с мутациями A12S, F13Y, T22S, Q42L, A45T, A67Q, G69S, Q92E и D94G + (G<sub>4</sub>S)<sub>1</sub> линкерная последовательность)

GGGGSSGAPRFLTRPLSYVVSVGKDALSSQIVGNPTPQVSWEKDQLPVTAGAR  
FRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLGVGAEA (SEQ ID  
NO: 84);

> O.23-L1 (O.9 с мутациями A12S, F13Y, T22S, Q42L, A45T, A67Q, G69S, Q92E и D94G, N-конец + DQPQF, + (G<sub>4</sub>S)<sub>1</sub> линкерная последовательность)

GGGGSDQPQFSGAPRFLTRPLSYVVSVGKDALSSQIVGNPTPQVSWEKDQLPV  
TAGARFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLGVGAEA  
(SEQ ID NO: 86).

Примечание: В приведенных выше последовательностях двойная подчеркнутая часть указывает на линкерную последовательность.

Антитела, в которых CH1/CL заменен, были сконструированы с использованием мутированной или домен-модифицированной цепи титин-Т и цепи обскурин-О, и связывающую активность антител, в которых CH1/CL заменен, в отношении антигена анализировали с помощью способа тестового примера 4 по настоящему изобретению. Результаты эксперимента приведены в таблице 8. Результаты показали, что антитела по-прежнему сохраняли хорошую антигенсвязывающую активность после того, как CH1/CL был заменен цепью титин-Т/цепью обскурин-О.

Таблица 8. Результаты анализа связывания антигена на антителах

Антитело		CH1/CL антитела и пептиды, заменяющие их		Анализ связывания с соответствующим антигеном EC50 (нМ)
		CH1	CL	
Серия B0	B0	CH1	CL	0,2
	B1	T.1	O.9	0,28
	B2	T.7	O.17	0,19
	B3	T.8	O.18	0,5
	B4	T.10	O.20	0,25
	B5	T.11	O.21	0,29

	B6	T.12	O.21	0,19
	B7	T.13	O.21	0,35
	B8	T.14	O.22	0,16
Серия U0	U0	CH1	CL	0,06
	U1	T.1	O.9	0,03
	U2	T.7	O.17	0,07
	U3	T.8	O.18	0,02
	U4	T.10	O.20	0,06
	U5	T.11	O.21	0,11
	U6	T.12	O.21	0,11
	U7	T.13	O.21	0,07
	U8	T.14	O.22	0,16
Серия D0	D0	CH1	CL	0,089
	D1	T.1	O.9	0,026
	D2	T.8	O.18	0,056
	D3	T.10	O.20	0,083
	D4	T.11	O.21	0,103
	D5	T.12	O.21	0,134
	D6	T.13	O.21	0,132
	D7	T.14	O.22	0,102
Серия I0	I0	CH1	CL	1,424
	I2	T.7	O.17	3,195
	I3	T.10	O.20	2,989
	I4	T.11	O.21	4,132
	I5	T.12	O.21	3,592
	I6	T.13	O.21	4,121
	I7	T.14	O.22	3,153

Примечание: В таблице, например, антитело «B1» в таблице указывает на антитело, полученное путем замены CH1 тяжелой цепи антитела B0 на цепь T.1 (SEQ ID NO: 35) и замены CL легкой цепи на цепь O.9 (SEQ ID NO: 50), при этом другие части являются такими же, как и у B0; и так далее для других.

Кроме того, уровень экспрессии белка антител с модифицированным доменом анализировали с помощью способа тестового примера 1 по настоящему изобретению. Результаты эксперимента приведены в таблице 9. Результаты показали, что уровень экспрессии антител был значительно улучшен некоторыми аминокислотными мутациями в цепи титин-Т/цепи обскурин-О.

Таблица 9. Уровень экспрессии антител с модифицированным доменом CH1/CL

Антитело		Пептиды, заменяющие CH1/CL		Уровень экспрессии антитела (мг/л)
		CH1	CL	
Серия B0	B1	T.1	O.9	9,4
	B2	T.7	O.17	25,6
	B3	T.8	O.18	13,9
	B4	T.10	O.20	21,4
Серия D0	D1	T.1	O.9	5,9
	D2	T.8	O.18	44,4
	D3	T.10	O.20	40,5
	D4	T.11	O.21	17,8
	D5	T.12	O.21	21,4
	D6	T.13	O.21	23,3
	D7	T.14	O.22	34,3
Серия I0	I1	T.1	O.9	2,1
	I2	T.7	O.17	11,0
	I3	T.10	O.20	10,4
	I4	T.11	O.21	4,0
	I5	T.12	O.21	4,6
	I6	T.13	O.21	8,2
	I7	T.14	O.22	6,9

Примечание: В таблице, например, антитело «B1» в таблице указывает на антитело, полученное путем замены CH1 тяжелой цепи антитела B0 на цепь T.1 (SEQ ID NO: 35) и замены CL легкой цепи на цепь O.9 (SEQ ID NO: 50), при этом другие части являются такими же, как и у B0; и так далее для других.

### III. Новая цепь титин-Т/цепь обскурин-О

## 1. Конструкция для аминокислотных мутаций в цепи титин-Т/цепи обскурин-О

Следующие мутации были внесены в цепь титин-Т/цепь обскурин-О на основе Т.10/О.20. Конкретные аминокислотные мутации показаны в таблице 10:

Таблица 10. Конструкция для аминокислотных мутаций в цепи титин-Т/цепи обскурин-О

Цепь титин-Т		Цепь обскурин-О	
Название	Тип мутации	Название	Тип мутации
T.16	T.10+ (L60S, I64T)	O.24	O.20+ (L11K, T32F, A48V)
T.17	T.10+ (V20C, L60S, I64T)	O.25	O.20+ (L11K, F13S, T32F, A48V, I82H)
T.18	T.10+ (A26C, L60S, I64T)	O.26	O.20+ (A3C, L11K, F13S, T32F, A48V, I82H)
		O.27	O.20+ (R9C, L11K, F13S, T32F, A48V, I82H)
		O.28	O.20+ (S25C, S76C, L11K, F13S, T32F, A48V, I82H)
		O.29	O.20+ (A3C, S25C, S76C, L11K, F13S, T32F, A48V, I82H)
		O.30	O.20+ (R9C, S25C, S76C, L11K, F13S, T32F, A48V, I82H)
		O.31	O.20+ (L66C, V93C, L11K, F13S, T32F, A48V, I82H)
		O.32	O.20+ (A3C, L66C, V93C, L11K, F13S, T32F, A48V, I82H)
		O.33	O.20+ (R9C, L66C, V93C, L11K, F13S, T32F, A48V, I82H)

Примечание: В таблицах, например, Т.16 указывает на цепь титин-Т, образованную путем замены аминокислотных остатков L60S и I64T на Т.10 (SEQ ID NO: 68); и так далее для других.

Последовательности цепи титин-Т/цепи обскурин-О после замен аминокислотных остатков являются следующими:

> Т.16 (Т.10 с мутациями L60S и I64T)

GIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHQSSEQGRFHIENTDDSTTL

TIKDVQKQDGGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 129)

> T.17 (T.10 с мутациями V20C, L60S и I64T)

GIPPKIECLPIDISIDEGKCLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHQSQEQRFHIENTDDSTTL  
TIKDVQKQDGGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 130)

> T.18 (T.10 с мутациями A26C, L60S и I64T)

GIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASCFTGEPTPEVTWSTGGRKIHQSQEQRFHIENTDDSTTL  
TIKDVQKQDGGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 131)

> O.24 (O.20 с мутациями L11K, T32F и A48V)

SGAPRFLTRPKAFVSVVGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRFRLAQDGDLY  
RLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACLGLQVDAEA (SEQ ID NO: 132)

> O.25 (O.20 с мутациями L11K, F13S, T32F, A48V и I82H)

SGAPRFLTRPKASVSVVGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRFRLAQDGDLY  
RLKILDLQLSDSGQYVSRARNAHGEAFACLGLQVDAEA (SEQ ID NO: 133)

> O.26 (O.20 с мутациями A3C, L11K, F13S, T32F, A48V и I82H)

SGCPRFLTRPKASVSVVGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRFRLAQDGDLY  
RLKILDLQLSDSGQYVSRARNAHGEAFACLGLQVDAEA (SEQ ID NO: 134)

> O.27 (O.20 с мутациями R9C, L11K, F13S, T32F, A48V и I82H)

SGAPRFLTCPKASVSVVGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRFRLAQDGDLY  
RLKILDLQLSDSGQYVSRARNAHGEAFACLGLQVDAEA (SEQ ID NO: 135)

> O.28 (O.20 с мутациями S25C, S76C, L11K, F13S, T32F, A48V и I82H)

SGAPRFLTRPKASVSVVGKDATLSCQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRFRLAQDGDLY  
RLKILDLQLSDSGQYVCRARNAHGEAFACLGLQVDAEA (SEQ ID NO: 136)

O.29 (O.20 с мутациями A3C, S25C, S76C, L11K, F13S, T32F, A48V и I82H)

SGCPRFLTRPKASVSVVGKDATLSCQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRFRLAQDGDLY  
RLKILDLQLSDSGQYVCRARNAHGEAFACLGLQVDAEA (SEQ ID NO: 137)

> O.30 (O.20 с мутациями R9C, S25C, S76C, L11K, F13S, T32F, A48V и I82H)

SGAPRFLTCPKASVSVVGKDATLSCQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRFRLAQDGDLY  
RLKILDLQLSDSGQYVCRARNAHGEAFACLGLQVDAEA (SEQ ID NO: 138)

> O.31 (O.20 с мутациями L66C, V93C, L11K, F13S, T32F, A48V и I82H)

SGAPRFLTRPKASVSVVGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRFRLAQDGDLY  
RLKILDCQLSDSGQYVSRARNAHGEAFACLGLQCDAEA (SEQ ID NO: 139)

> O.32 (O.20 с мутациями A3C, L66C, V93C, L11K, F13S, T32F, A48V и I82H)

SGCPRFLTRPKASVSVVGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRFRLAQDGDLY  
RLKILDCQLSDSGQYVSRARNAHGEAFACLGLQCDAEA (SEQ ID NO: 140)

> O.33 (O.20 с мутациями R9C, L66C, V93C, L11K, F13S, T32F, A48V и I82H)

SGAPRFLTCPKASVVSVGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRFRLAQDGDLY  
RLKILDCQLSDSGQYVSRARNANGEAFAACLGLQCDAEA (SEQ ID NO: 141)

2. Биспецифическое антитело DI, сконструированное с использованием цепи титин-Т/цепи обскурин-О, и анализ

Конструкция биспецифических антител DI к hNGF и hRANKL: от DI-2 до DI-20, содержащих первую тяжелую цепь, вторую тяжелую цепь, первую легкую цепь и вторую легкую цепь, как описано ниже:

первая тяжелая цепь содержит [VH1]-[линкер 1]-[цепь обскурин-О]-[линкер 3]-[Fc1] в порядке от N-конца к С-концу,

первая легкая цепь содержит [VL1]-[линкер 2]-[цепь титин-Т] в порядке от N-конца к С-концу,

вторая тяжелая цепь содержит [VH2]-[CH1]-[Fc2] в порядке от N-конца к С-концу, и вторая легкая цепь содержит [VL2]-[CL] в порядке от N-конца к С-концу;

где VH1 и VL1 представляют собой переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи I0, VH2 и VL2 представляют собой переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи D0, VH1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, VL1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, VH2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, и VL2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25; Fc1 (с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 177) представляет собой первую субъединицу Fc IgG1, содержащую мутацию по типу впадины, и Fc2 (с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 178) представляет собой вторую субъединицу Fc IgG1, содержащую мутацию по типу выступа; CH1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 179, и CL имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4; N-конец цепи обскурин-О связан с VH1 посредством линкера 1, С-конец цепи обскурина-О связан с Fc1 посредством связи (то есть линкер 3 представляет собой связь), а N-конец цепи титин-Т связан с VL1 посредством линкера 2. Структуры цепи обскурин-О/цепи титин-Т, линкера 1 и линкера 2 в различных биспецифических антителах DI в этом примере показаны в таблице 11.

Таблица 11. Цепь обскурин-О/цепь титин-Т и линкеры в биспецифических антителах DI

Биспецифическое антитело №	Первая тяжелая цепь		Первая легкая цепь	
	Цепь обскурин-О	Линкер 1	Цепь титин-Т	Линкер 2

DI-2	0.20	GGGGS	T.10	GGGGS
DI-3	0.25	GGGGS	T.16	GGGGS
DI-4	0.26	GGGGS	T.17	GGGGS
DI-5	0.27	GGGGS	T.18	GGGGS
DI-6	0.28	GGGGS	T.16	GGGGS
DI-7	0.29	GGGGS	T.17	GGGGS
DI-8	0.30	GGGGS	T.18	GGGGS
DI-9	0.31	GGGGS	T.16	GGGGS
DI-10	0.32	GGGGS	T.17	GGGGS
DI-11	0.33	GGGGS	T.18	GGGGS
DI-12	0.25	ASTKG	T.16	RTVAS
DI-13	0.26	ASTKG	T.17	RTVAS
DI-14	0.27	ASTKG	T.18	RTVAS
DI-15	0.28	ASTKG	T.16	RTVAS
DI-16	0.29	ASTKG	T.17	RTVAS
DI-17	0.30	ASTKG	T.18	RTVAS
DI-18	0.31	ASTKG	T.16	RTVAS
DI-19	0.32	ASTKG	T.17	RTVAS
DI-20	0.33	ASTKG	T.18	RTVAS

Активность связывания биспецифических антител от DI-2 до DI-20 в отношении их антигенов анализировали с помощью способа тестового примера 4 по настоящему изобретению. Кроме того, испытание на термическую стабильность проводили для DI-2, от DI-4 до DI-8, от DI-10 до DI-16 и DI-20 следующим способом: каждое антитело разбавляли до концентрации 5 мг/мл раствором PBS (фосфатно-солевой буферный раствор) и тестировали на термическую стабильность с помощью Unit (объем загрузки: 9 мкл; настройки параметров: начальная температура: 20 °C; инкубация: 0 с; скорость: 0,3 °C/мин; выдержка планшета: 5 с; конечная температура: 95 °C). Экспериментальные результаты приведены в таблицах 12 и 13. Экспериментальные результаты показали, что активность связывания модифицированных биспецифических антител в отношении антигена существенно не изменилась; между тем, от DI-4 до DI-8, от DI-10 до DI-16 и DI-20 имели значительно улучшенную  $T_{m1}$  (°C) и  $T_{onset}$  (°C) по сравнению с DI-2, и, следовательно,



биспецифические антитела имели лучшую термическую стабильность.

Таблица 12. Анализ активности связывания на биспецифических антителах DI

Биспецифическое антитело №	RANKL EC50 (нМ)	NGF EC50 (нМ)
DI-2	0,3832	6,633
DI-3	0,3613	5,7730
DI-4	0,3959	6,2930
DI-5	0,3290	6,1890
DI-6	0,2509	5,6720
DI-7	0,2557	6,6430
DI-8	0,3643	7,6250
DI-9	0,2944	8,4950
DI-10	0,3460	7,1660
DI-11	0,3721	10,9600
DI-12	0,4125	6,5156
DI-13	0,4440	5,5420
DI-14	0,4182	3,2610
DI-15	0,2206	5,2800
DI-16	0,1474	5,5140
DI-17	0,2329	6,7270
DI-18	0,2662	5,9080
DI-19	0,1843	5,9280
DI-20	0,3184	6,4250

Таблица 13. Результаты испытания термической стабильности для биспецифических антител DI

Биспецифическое антитело №	Tm1 (°C)	Tonset (°C)
DI-2	55,6	48,3
DI-4	60,1	52,493
DI-5	61	51,967
DI-6	60,8	53,012

DI-7	60,34	52,003
DI-8	60,61	50,425
DI-10	60,2	52,766
DI-11	57,35	-
DI-12	59,9	51,726
DI-13	61	50,988
DI-14	61,2	52,191
DI-15	60,41	50,558
DI-16	61,5	50,691
DI-20	60,7	51,859

Кроме того, растворы биспецифических антител DI составляли с буфером, содержащим 10 мМ уксусной кислоты при pH 5,5 и 9% сахарозу (см. Таблицу 14 для подробностей), и растворы инкубировали в инкубаторе при 40 °С в течение четырех недель. После окончания инкубации на четвертой неделе биспецифические антитела концентрировали до концентрации в начале инкубации и наблюдали осаждение растворов. Экспериментальные результаты показаны в Таблице 14 ниже. Экспериментальные результаты показали, что в группе раствора биспецифических антител DI-2 имело место осаждение, и, следовательно, от DI-3 до DI-7 имели лучшую стабильность, чем DI-2.

Таблица 14. Осаждение растворов биспецифических антител DI

Группа	Биспецифическое антитело №	Исходная концентрация	Концентрация, которая должна быть достигнута на неделе 4	Осаждение растворов
1	DI-2	20 мг/мл	20 мг/мл	Выпадение осадка
2	DI-3	20 мг/мл	20 мг/мл	Без осадка
3	DI-4	60 мг/мл	60 мг/мл	Без осадка
4	DI-5	25 мг/мл	25 мг/мл	Без осадка
5	DI-6	60 мг/мл	60 мг/мл	Без осадка
6	DI-7	16 мг/мл	16 мг/мл	Без осадка

3. Биспецифическое антитело PL, сконструированное с помощью цепи титин-Т/цепи обскурин-О, и анализ

Конструкция биспецифических антител PL в отношении hPDL1 и hCTLA4: от PL-1 до PL-19, содержащие первую тяжелую цепь, вторую тяжелую цепь, первую легкую цепь и вторую легкую цепь, как описано ниже:

первая тяжелая цепь содержит [VH1]-[линкер 1]-[цепь обскурин-О]-[линкер 3]-[Fc1] в порядке от N-конца к С-концу,

первая легкая цепь содержит [VL1]-[линкер 2]-[цепь титин-Т] в порядке от N-конца к С-концу,

вторая тяжелая цепь содержит [VH2]-[CH1]-[Fc2] в порядке от N-конца к С-концу, и

вторая легкая цепь содержит [VL2]-[CL] в порядке от N-конца к С-концу;

где VH1 и VL1 представляют собой переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи антитела P0 (т.е., антитело h1831K в WO2020177733A1), VH2 и VL2 представляют собой переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи антитела L0, VH1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 156, VL1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 155, VH2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 169, и VL2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 170; Fc1 (с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 178) представляет собой первую субъединицу Fc IgG1, содержащую мутацию по типу выступа, и Fc2 (с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 177) представляет собой вторую субъединицу Fc IgG1, содержащую мутацию по типу впадины; CH1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 179, и CL имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4; N-конец цепи обскурин-О связан с VH1 посредством линкера 1, С-конец цепи обскурина-О непосредственно связан с Fc1 посредством связи (то есть линкер 3 представляет собой связь), а N-конец цепи титин-Т связан с VL1 посредством линкера 2. Структуры цепи обскурин-О/цепи титин-Т, линкера 1 и линкера 2 в различных биспецифических антителах PL в этом примере показаны в таблице 15.

Таблица 15. Цепь обскурин-О/цепь титин-Т и линкеры в биспецифических антителах PL

Биспецифическое антитело №	Первая тяжелая цепь		Первая легкая цепь	
	Цепь обскурин-О	Линкер 1	Цепь титин-Т	Линкер 2
PL-1	O.20	GGGS	T.10	GGGS
PL-2	O.25	GGGS	T.16	GGGS
PL-3	O.26	GGGS	T.17	GGGS

PL-4	O.27	GGGGS	T.18	GGGGS
PL-5	O.28	GGGGS	T.16	GGGGS
PL-6	O.29	GGGGS	T.17	GGGGS
PL-7	O.30	GGGGS	T.18	GGGGS
PL-8	O.31	GGGGS	T.16	GGGGS
PL-9	O.32	GGGGS	T.17	GGGGS
PL-10	O.33	GGGGS	T.18	GGGGS
PL-11	O.25	ASTKG	T.16	RTVAS
PL-12	O.26	ASTKG	T.17	RTVAS
PL-13	O.27	ASTKG	T.18	RTVAS
PL-14	O.28	ASTKG	T.16	RTVAS
PL-15	O.29	ASTKG	T.17	RTVAS
PL-16	O.30	ASTKG	T.18	RTVAS
PL-17	O.31	ASTKG	T.16	RTVAS
PL-18	O.32	ASTKG	T.17	RTVAS
PL-19	O.33	ASTKG	T.18	RTVAS

Вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи антитела к CTLA-4 Ипилимумаба (сокращенно L0, торговое название: Yervoy) являются следующими:

Вариабельная область тяжелой цепи L0:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNNK  
YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGGTLVTV  
SS (SEQ ID NO: 169)

Вариабельная область легкой цепи L0:

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPD  
RFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 170)

В качестве иллюстрации, последовательности четырех цепей PL-1 показаны следующим образом:

Аминокислотная последовательность первой тяжелой цепи PL-1:

**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWM  
GRITPSSGFAMYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARG  
GSSYDYFDYWGGQTTVTVSSGGGGSSGAPRFLTRPLAFVVSVGKDATLSSQIV  
GNPTPQVSWEKDKQPVTAGARFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNA  
IGEAFACLGLQVDAEADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV  
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSL  
WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ  
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 142)**

Аминокислотная последовательность первой легкой цепи PL-1:

**DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMHWYQQKPGQPPELLI  
YAASKLESGVPARFSGSGGTDFTLTINPVEAEDTANYYCQQSFEDPLTFGQ  
GTKLEIKGGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKI  
HSQEQGRFHIENTDDLTTLIKDVQKQDGGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI  
(SEQ ID NO: 143)**

Аминокислотная последовательность второй тяжелой цепи PL-1:

**QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWWT  
FISYDGNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTG  
WLGPFDYWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS  
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV  
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW  
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSC  
AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 144)**

Аминокислотная последовательность второй легкой цепи PL-1:

**EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGA  
FSRATGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTK  
VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG  
NSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR  
GEC (SEQ ID NO: 145)**

Примечание: В приведенных выше последовательностях выделенная жирным часть указывает на переменную область, точечная подчеркнутая часть указывает на часть Fc, выделенная волнистой линией часть указывает на CH1, пунктирная подчеркнутая часть указывает на CL, двойная подчеркнутая часть указывает на линкер, а сплошная подчеркнутая часть указывает на цепь обскурин-О/цепь титин-Т.

Связывающую активность биспецифических антител PL тестировали с помощью

анализа ELISA согласно тестовому примеру 4 по настоящему изобретению (где антигены hPDL1 и hCTLA4 были приобретены у Sino Biology). Кроме того, испытание на термическую стабильность проводили на биспецифических антителах PL с использованием высокопроизводительной дифференциальной сканирующей флуориметрии (UNCHAINED, спецификация: Unit) следующим способом: 9 мкл каждого из образцов (концентрация биспецифических антител PL: 1,4-3 мг/мл), разбавленных в растворе PBS (фосфатно-солевой буфер), загружали в лунки для образцов с настройками параметров следующим образом: начальная температура: 25 °C, инкубация: 180 с, скорость: 0,3 °C/мин, выдержка планшета: 3 с, конечная температура: 95 °C, и прибор запускали. Экспериментальные результаты анализировали с использованием программного обеспечения Uncle Analysis.

Экспериментальные результаты приведены в таблицах 16 и 17. Экспериментальный результат показал, что биспецифические антитела PL, сконструированные с помощью новой цепи титин-Т/цепи обскурин-О, все еще обладают хорошей активностью связывания с антигеном; между тем, от PL-2 до PL-19 имели значительно улучшенную  $T_m1$  (°C), Tagg 266 (°C) и Tonset (°C) по сравнению с PL-1, и, следовательно, биспецифические антитела имели лучшую термическую стабильность.

Таблица 16. Результаты анализа связывания антигена на биспецифических антителах PL

Биспецифическое антитело №	EC50 (нМ) для связывания с антигеном hPDL1	EC50 (нМ) для связывания с антигеном hCTLA4
PL-1	1,6	16,5
PL-2	0,5	8,0
PL-3	0,6	7,9
PL-4	0,7	6,5
PL-5	0,7	6,7
PL-6	0,8	5,3
PL-7	0,5	7,3
PL-8	1,4	14,5
PL-9	0,6	5,5
PL-10	0,6	6,9
PL-11	0,6	5,6
PL-12	0,5	8,0
PL-13	0,5	4,4
PL-14	1,3	6,0

PL-15	1,4	3,2
PL-17	1,4	6,2
PL-18	1,6	6,7
PL-19	1,6	6,5

Таблица 17. Результаты испытания термической стабильности для биспецифических антител PL

Биспецифическое антитело №	Tm1 (°C)	Tagg 266 (°C)	Tначало (°C)
PL-1	61,64	64,82	52,566
PL-2	66,20	66,55	58,317
PL-3	64,07	68,28	57,661
PL-4	70,71	67,29	56,246
PL-5	74,56	68,11	58,407
PL-6	70,43	70,12	61,069
PL-7	68,46	67,41	63,031
PL-8	65,00	-	-
PL-9	69,24	67,83	58,597
PL-10	69,63	68,12	56,788
PL-11	65,88	-	57,976
PL-12	65,54	67,94	-
PL-13	71,85	68,17	58,581
PL-14	74,18	69,42	58,589
PL-15	70,96	69,91	58,622
PL-16	63,48	68,98	58,702
PL-17	70,15	69,86	56,193
PL-18	-	69,43	-
PL-19	-	69,52	57,766

4. Биспецифическое антитело HJ, сконструированное с цепью титин-Т/цепь обскурина-О, и анализ

Конструкция биспецифических антител HJ в отношении hIL5 и hTSLP: от HJ-3 до HJ11, содержащие первую тяжелую цепь, вторую тяжелую цепь, первую легкую цепь и вторую легкую цепь, как описано ниже:

первая тяжелая цепь содержит [VH1]-[линкер 1]-[цепь титин-Т]-[линкер 3]-[Fc1] в порядке от N-конца к С-концу;

первая легкая цепь содержит [VL1]-[линкер 2]-[цепь обскурин-О] в порядке от N-конца к С-концу;

вторая тяжелая цепь содержит [VH2]-[CH1]-[Fc2] в порядке от N-конца к С-концу, и

вторая легкая цепь содержит [VL2]-[CL] в порядке от N-конца к С-концу;

где VH1 и VL1 представляют собой переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи антитела H0, VH2 и VL2 представляют собой переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи антитела J1, VH1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, VL1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, VH2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 171, и VL2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 172; Fc1 (с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 178) представляет собой первую субъединицу Fc IgG1, содержащую мутацию по типу выступа, и Fc2 (с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 177) представляет собой вторую субъединицу Fc IgG1, содержащую мутацию по типу впадины; CH1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 179, и CL имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4; N-конец цепи титин-Т связан с VH1 посредством линкера 1, С-конец цепи титин-Т непосредственно связан с Fc1 посредством связи (то есть линкер 3 представляет собой связь), а N-конец цепи обскурин-О связан с VL1 посредством линкера 2. Структуры цепи титин-Т/цепи обскурин-О, линкера 1 и линкера 2 в различных биспецифических антителах HJ показаны в таблице 18.

Таблица 18. Цепь обскурин-О/цепь титин-Т и линкеры в биспецифических антителах HJ

Биспецифическое антитело №	Первая тяжелая цепь		Первая легкая цепь	
	Цепь титин-Т	Линкер 1	Цепь обскурин-О	Линкер 2
HJ-3	T.10	GGGGS	O.20	GGGGS
HJ-5	T.16	GGGGS	O.25	GGGGS
HJ-6	T.16	GGGGS	O.27	GGGGS



HJ-7	T.16	GGGGS	O.28	GGGGS
HJ-8	T.16	ASTKG	O.25	RTVAS
HJ-9	T.16	ASTKG	O.27	RTVAS
HJ-10	T.16	ASTKG	O.28	RTVAS
HJ-11	T.16	ASTKG	O.29	RTVAS

Активность связывания биспецифических антител HJ-3 и от HJ-5 до HJ-11 в отношении антигенов hIL5 и hTSLP анализировали с помощью способа тестового примера 4 по настоящему изобретению. Кроме того, испытание на термическую стабильность проводили на биспецифических антителах следующим способом: разбавления биспецифических антител HJ составляли с помощью буфера, содержащего 10 мМ уксусной кислоты при pH 5,5 и 9% сахарозы; биспецифические антитела концентрировали путем ультрафильтрации и концентрирования с получением различных концентраций растворов (концентрации биспецифических антител HJ показаны в Таблице 19-2) биспецифических антител HJ; концентрированные растворы инкубировали в инкубаторе при 40 °C, и образцы тестировали на чистоту SEC на день 0 (т.е. перед началом инкубации при 40 °C, D0), день 7 (7-й день инкубации при 40 °C, D7), день 14 (14-й день инкубации при 40 °C, D14), день 21 (21-й день инкубации при 40 °C, D21) и день 28 (28-й день инкубации при 40 °C, D28); после 28 дней инкубации при 40 °C образцы немедленно отбирали для определения чистоты согласно невосстанавливающему CE-SDS.

Экспериментальные результаты приведены в таблицах 19-1 и 19-2 ниже. Экспериментальные результаты показали, что связывающая активность биспецифических антител HJ, сконструированных в настоящем изобретении, в отношении антигена существенно не изменилась; между тем, биспецифические антитела от HJ-5 до HJ-11 имели лучшую термическую стабильность, чем HJ-3.

Таблица 19-1 Анализ активности связывания на биспецифических антителах HJ

Биспецифическое антитело №	hIL5	hTSLP	Биспецифическое антитело №	hIL5	hTSLP
	EC50 (нМ)			EC50 (нМ)	
HJ-3	17,38	3,234	HJ-8	18,74	3,332
HJ-5	15,96	2,639	HJ-9	10,86	3,184
HJ-6	37,05	2,884	HJ-10	20,81	3,173
HJ-7	17,69	2,182	HJ-11	9,464	3,005

Таблица 19-2. Результаты испытания стабильности в условиях ускоренного старения биспецифических антител HJ

Биспецифическое антитело №	D0 Концентрация (мг/мл)	D0 Чистота SEC (%)	D28 Чистота SEC (%)	D28 Δ чистота SEC (%)	D28 чистота по невосстанавливающему CE-SDS (%)
HJ-3	50	98	84	14	67
HJ-5	60,8	98,09	93,86	4,23	82,93
HJ-6	54	98,14	89,68	8,46	80,76
HJ-7	56,8	97,7	92,72	4,98	85,47
HJ-8	62,6	93,39	84,28	9,11	73,03
HJ-9	53,5	90,01	85,93	4,08	80,32
HJ-10	69,8	90,9	88,31	2,59	80,4
HJ-11	50,4	92,55	90,89	1,66	82,96

Примечание:  $D28 \Delta \text{чистота SEC (\%)} = D0 \text{ чистота SEC (\%)} - D28 \text{ чистота SEC (\%)}$

Пример 4. Период полувыведения антитела с модифицированным доменом CH1/CL

Чтобы оценить, была ли затронута стабильность антител у животных после замены CH1/CL антител цепью титин-Т/цепью обскурин-О или цепью титин-Т/цепью обскурин-подобный-О, определяли период полувыведения антител у крыс до и после замены CH1/CL. В качестве иллюстрации были определены периоды полувыведения у крыс антитела F20, в котором CH1/CL антитела F0 был заменен на T.1/O.9, и антитела C3, в котором CH1/CL антитела C0 был заменен на T.1/O.9. Конкретные процедуры являлись следующими:

Антитело в концентрации 3 мг/кг вводили внутривенно крысам и собирали 0,3 мл цельной крови через 5 мин, 8 ч, 1 д, 2 д, 4 д, 7 д, 10 д, 14 д, 21 д и 28 д после введения без антикоагулянта. После отбора крови указанную кровь оставляли стоять при 4 °C в течение 30 мин и центрифугировали при 1000 g в течение 15 мин, а супернатант (сыворотку) помещали в пробирку EP и хранили при минус 80 °C. Метод анализа концентраций лекарственного средства на основе антитела в каждой временной точке представлял собой сэндвич-ELISA. В частности, планшет для ELISA покрывали соответствующими антигенами, инкубировали при 4 °C в течение ночи, а затем промывали промывочным буфером; добавляли блокирующий буфер, и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1-3 ч, а затем промывали промывочным буфером; добавляли 100 мкл стандартного или тестируемого образца сыворотки, и планшет инкубировали при 37 °C в

течение 3 ч, а затем промывали промывочным буфером; добавляли предварительно абсорбированное вторичное мышинное антитело к FC IgG человека (HRP) (Abcam, кат. № ab98624, разведение 1:10000) и планшет инкубировали при 37 °C в течение 1-1,5 ч, а затем промывали буфером; добавляли ТМВ (тетраметилбензидин) и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин в темноте; добавляли стоп-буфер и считывали значения OD450.

Результаты эксперимента приведены в таблице 20. Результаты показали, что после замены CH1/CL антитела цепью титин-Т/обскурин-О указанное антитело все еще сохраняло тот же период полувыведения, что и исходное антитело у крысы, что указывает на то, что антитело после замены CH1/CL имело такую же хорошую стабильность *in vivo*, что и исходное антитело.

Таблица 20. Период полувыведения антител, в которых домен CH1/CL заменен

Название антитела	Период полувыведения <i>in vivo</i> у крыс (3 мг/кг) T1/2 (день)
F0	13,3±1,0
F20	12,8±0,3
C0	17,3±2,2
C3	15,4±4,1

#### Пример 5: Конструирование и обнаружение биспецифических антител

Антитело, связывающееся с первым антигеном, и антитело, связывающееся со вторым антигеном А, использовали для конструирования биспецифических антител с помощью ПЦР с избыточной пролонгацией перекрывания. В качестве иллюстрации, были сконструированы различные биспецифические антитела.

##### I. Конструирование биспецифического антитела

Во-первых, было сконструировано биспецифическое антитело DI-1, содержащее одну тяжелую цепь (с модификацией по типу выступа в области Fc) и одну легкую цепь антитела D0, а также одну тяжелую цепь и одну легкую цепь антитела I0 с модифицированным доменом (CH1/CL заменен цепью титин-Т/обскурин-О, а область Fc содержит модификацию по типу впадины). Биспецифическое антитело DI-1 представляет собой IgG-подобное биспецифическое антитело, схематическое структурное изображение которого показано на фиг. 5, а последовательности 4 цепей DI-1 показаны следующим образом:

Аминокислотная последовательность цепи 1 DI-1 (DI-1-H1):

**EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSG  
ITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPG  
TTVIMSWFDPWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY  
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH  
KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV  
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAK*GQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSL  
WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO: 87).

Примечание: В последовательности выделенная жирным часть обозначает VH D0, сплошная подчеркнутая часть обозначает CH1, точечная подчеркнутая часть обозначает CH2, и курсивная часть обозначает CH3.

Аминокислотная последовательность цепи 2 DI-1 (DI-1-L1):

**EIVLTQSPGTL**SLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGA  
SSRATGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVFYCQQYGSSPRTFGQGTKV  
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN  
SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG  
EC (SEQ ID NO: 88).

Примечание: в последовательности выделенная жирным часть обозначает VL D0, и сплошная подчеркнутая часть обозначает константную область CL легкой цепи D0.

Аминокислотная последовательность цепи 3 DI-1 (DI-1-H2):

**QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIW  
GDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYA  
TSYYFDYWGQGTLVTVSS**GGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTP  
EVTWSTGGRKIHSQEQRFHIENTDDLTLIKDVQKQDGGGLYTLTLRNEFGSDS  
ATVNIHIRSIDKTHCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV  
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
YKCKVSNKALPAPIEKTKAK*GQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYP  
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE  
ALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO: 89).

Примечание: В последовательности выделенная жирным часть обозначает VH I0, сплошная подчеркнутая часть обозначает T.10, двойная подчеркнутая часть обозначает линкерную последовательность, выделенная точечной линией часть обозначает CH2, курсивная часть обозначает CH3, и двойная подчеркнутая часть обозначает линкерную последовательность.

Аминокислотная последовательность цепи 4 DI-1 (DI-1-L2):

**DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTS  
RFHSGVPSRFRSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCQQEHTLPYTFGQGTKL  
EIKGGGGSSGAPRFLTRPLAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDKQPVTA  
GARFRLAQDGDLYRLKILDQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACLGLQVDAEA**  
(SEQ ID NO: 90).

Примечание: В последовательности выделенная жирным часть обозначает VL I0, сплошная подчеркнутая часть обозначает O.20, и двойная подчеркнутая часть обозначает линкерную последовательность.

Кроме того, IgG-подобные биспецифические антитела BU были сконструированы из B0 или антитела B0 с модифицированным доменом и U0 или антитела U0 с модифицированным доменом (в качестве иллюстрации, схематическое структурное изображение BU5 показано на фиг. 8). Последовательности четырех цепей полученных биспецифических антител приведены в таблице 21 ниже:

Таблица 21. Перечень последовательностей IgG-подобных биспецифических антител BU

Биспецифическое антитело №	Последовательности четырех цепей IgG-подобных биспецифических антител			
	Цепь 1	Цепь 2	Цепь 3	Цепь 4
BU1	Тяжелая цепь B0 (выступ)	Легкая цепь B0	Тяжелая цепь U0 (впадина), в которой CH1 заменена на T.14-L1	Легкая цепь U0, в которой CL заменена на O.22-L1
	<b>QVQLQQSGAEV KKPGSSVRVSCK ASGGTFNNAIN</b>	<b>SSELTQDPAVSV LGQTVRVTCQG DSLRSYYASWYQ</b>	<b>EVQLVQSGAEVK KPGESLKISCKG SGYSFTTYWLG</b>	<b>DIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITCRA SQGISSWLAWYQ</b>

	<p>WVRQAPGQGLE WMGGIIPMFGT AKYSQNFQGRVA ITADESTGTASM ELSSLRSED TAVY YCARSRDLLLFP HHALSPWGRGT MVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPVAV LQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYI CENVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPPKPD TLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKC KVS NKALPAPIEK TISKAKGQPREPQ VYTLPPCREEMTK NQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLD SDGSFFLYSKLTV KSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 91)</p>	<p>QKPGQAPVLVIY GKNNRPSGIPDR FSGSSSGNTASLT ITGAQAEDEADY YCSSRDSSGNHW VFGGGTELTVLG QPKAAPSVTLFPP SSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTV AWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNNK YAASSYLSLTPEQ WKS HRYSYCQVT HEGSTVEKTVAPT ECS (SEQ ID NO: 92)</p>	<p>WVRQMPGKGL DWIGIMSPVSD IRYSPSFQGGQVT MSVDKSITTAYL QWNSLKASDTA MYYCARRRPGQ GYFDFWGGQTL VTVSSGGGGSGIP PKIECLPSDISIDE GKVLTVASAFTGE PTPEVTWSTGGR KIHSOEOGRFHIE STEDLTTLISDVQ KQDGGLYSLSLG NEFGSDSATVNIH IRSIDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPPS REEMTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG K (SEQ ID NO: 93)</p>	<p>QKPEKAPKSLIY AASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATY YCCQYNIYPYTF GQGTKLEIKGGG GSSGAPRELTRPL SYVVS VGKDASL SSQIVGNPTPOVS WEKDQLPVTAGA RFRLAQDGDLYR LKILDLOLSDSGQ YVSRARNAIGEA ACVGLEVGAEA (SEQ ID NO: 94)</p>
BU2	Тяжелая цепь U0 (выступ)	Легкая цепь U0	Тяжелая цепь B0 (впадина), в которой CH1 заменена T.14-L1	Легкая цепь B0, в которой CL заменена на O.23- L1

	<p>EVQLVQSGAEVK KPGESLKISCKG SGYSFTTYWLG WVRQMPGKGL DWIGIMSPVDS IRYSPSFQGV MSVDKSITTAYL QWNSLKASDTA MYYCARRRPGQ GYFDWFGQGL VTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGA LTSQVHTFPAVLO SSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNA KTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQV YTLPPCREEMTKN QVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQP ENNYKTPPVLD DGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 95)</p>	<p>DIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCR ASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLI YAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDF LTISSLOPEDEFAT YYCQQYNIYPYT FGQGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCCL NNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDY SLSSLTLSKADY EKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO: 96)</p>	<p>QVQLQQSGAEV KKPGSSVRVCSK ASGGTFNINAIN WVRQAPGQGLE WMGGIIPMFGT AKYSONFQGRVA ITADESTGTASM ELSSLRSEDVAVY YCARSRDLLLP HHALSPWGRGT MVTVSSGGGGSG IPPKIECLPSDISID EGKVLTVASAFTG EPTPEVTWSTGG RKIHSOEQGRFHI ESTEDLTTLISDV OKODGGGLYSLSL GNEFGSDSATVNI HIRSIDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDV HEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPSS REEMTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLV SKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG K (SEQ ID NO: 97)</p>	<p>SSELTQDPAVSV LGQTVRVTCQG DSLRSYYASWYQ QKPGQAPVLVIY GKNNRPSGIPDR FSGSSSGNTASLT ITGAQAEDEADY YCSSRDSSGNHW VFGGGTELTVLG GGGSDQPFSGA PREFLRPLSYVVS VGKDASLSSQIVG NPTPOVSWEKQDQ LPVTAGARFRLA QDGDLYRLKILD QLSDSGQYVSRA RNAIGEAFAACVGL EVGAEA (SEQ ID NO: 98)</p>
BU3	Тяжелая цепь B0 (выступ), в которой CH1 заменена на T.14- L1	Легкая цепь B0, в которой CL заменена на O.23- L1	Тяжелая цепь U0 (впадина)	Легкая цепь U0

	<p>QVQLQQSGAEV  KKPGSSVRVSCK  ASGGTFNNAIN  WVRQAPGQGLE  WMGGIIPMFGT  AKYSQNFQGRVA  ITADESTGTASM  ELSSLRSED TAVY  YCARSRDLLLFP  HHALSPWGRGT  MVTVSSGGGGSG  <u>IPPKIECLPSDISID</u>  <u>EGKVLTVASAFTG</u>  <u>EPTPEVTWSTGG</u>  <u>RKIHSQEQGRFHI</u>  <u>ESTEDLTTLISDV</u>  <u>QKQDGGLYSLSL</u>  <u>GNEFGSDSATVNI</u>  <u>HIRSIDKTHTCPPC</u>  <u>PAPEAAGGPSVFL</u>  <u>FPPKPKDTLMISR</u>  <u>TPEVTCVVVDVS</u>  <u>HEDPEVKFNWYV</u>  <u>DGVEVHNAKTKP</u>  <u>REEQYNSTYRVV</u>  <u>SVLTVLHQDWLN</u>  <u>GKEYKCKVSNKA</u>  <u>LPAPIEKTISKAKG</u>  <u>QPREPQVYTLPPC</u>  <u>REEMTKNQVSLWC</u>  <u>LVKGFYPSDIAVEW</u>  <u>ESNGQPENNYKTT</u>  <u>PPVLDSDGSFFLYS</u>  <u>KLTVDKSRWQQG</u>  <u>NVFSCVMHEALH</u>  <u>NHYTQKSLSLSPG</u>  K (SEQ ID NO: 99)</p>	<p>SSELTQDPAVSVA  LGQTVRVTCQG  DSLRSYYASWYQ  QKPGQAPVLVIY  GKNNRPSGIPDR  FSGSSSGNTASLT  ITGAQAEDEADY  YCSSRDSSGNHW  VFGGGTELTVLG  <u>GGGSDQPQFSGA</u>  <u>PRFLTRPLSYVVS</u>  <u>VGKDASLSSQIVG</u>  <u>NPTPQVSWEKDQ</u>  <u>LPVTAGARFRLA</u>  <u>QDGDLYRLKIDL</u>  <u>QLSDSGQYVSRA</u>  <u>RNAIGEAFACVGL</u>  <u>EVGAEA</u> (SEQ ID  NO: 100)</p>	<p>EVQLVQSGAEVK  KPGESLKISCKG  SGYSFTTYWLG  WVRQMPGKGL  DWIGIMSPVDS  IRYSPSFQGGQVT  MSVDKSITTAYL  QWNSLKASDTA  MYCARRRPGQ  <u>GYDFWGGQTL</u>  <u>VTVSSASTKGPSV</u>  <u>FPLAPSSKSTSGG</u>  <u>TAALGCLVKDYF</u>  <u>PEPVTVSWNSGA</u>  <u>LTSGVHTFPAVLQ</u>  <u>SSGLYSLSSVTV</u>  <u>PSSSLGTQTYICN</u>  <u>VNHKPSNTKVKDK</u>  <u>KVEPKSCDKTHT</u>  <u>CPPCPAPEAAGGP</u>  <u>SVFLFPPKPKDTL</u>  <u>MISRTPEVTCVVV</u>  <u>DVSHEDPEVKFN</u>  <u>WYVDGVEVHNA</u>  <u>KTKPREEQYNST</u>  <u>YRVVSVLTVLHQ</u>  <u>DWLNGKEYKCK</u>  <u>VSNKALPAPIEKTI</u>  <u>SKAKGQPREPQV</u>  <u>CTLPPSREEMTKN</u>  <u>QVSLSCAVKGFYPS</u>  <u>DIAVEWESNGQPE</u>  <u>NNYKTPPVLDSD</u>  <u>GSFFLVSKLTVDKS</u>  <u>RWQQGNVFSCSV</u>  <u>MHEALHNHYTQKS</u>  <u>LSLSPGK</u> (SEQ ID  NO: 101)</p>	<p>DIQMTQSPSSLSA  SVGDRVITICRA  SQGISSWLAWYQ  QKPEKAPKSLIY  AASSLQSGVPSR  FSGSGSGTDFTL  TISSLQPEDFATY  YCQQYNIYPYTF  GQGTKLEIKRTV  <u>AAPSVFIFPPSDEQ</u>  <u>LKSGTASVVCLLN</u>  <u>NFYPREAKVOWK</u>  <u>VDNALQSGNSQE</u>  <u>SVTEQDSKDYSTYS</u>  <u>LSSTLTLSKADYE</u>  <u>KHKVYACEVTHQ</u>  <u>GLSSPVTKSFNRG</u>  <u>EC</u> (SEQ ID NO:  96)</p>
BU4	Тяжелая цепь U0 (выступ)	Легкая цепь U0	Тяжелая цепь B0 (впадина), в которой CH1 заменена на T.15- L1	Легкая цепь B0, в которой CL заменена на O.23- L1



	<p>EVQLVQSGAEVK KPGESLKISCKG SGYSFTTYWLG WVRQMPGKGL DWIGIMSPVDS IRYSPSFQGV MSVDKSITAYL QWNSLKASDTA MYYCARRRPGQ GYFDWVQGT VTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGA LTSQVHTFPAVLO SSGLYSLSSVTV PSSSLGTOTYICN VNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVYV DVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNA KTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQV YTLPPCREEMTKN QVSLWCLVKGFP SDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVD KSRWQOGNVFSCS VMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 95)</p>	<p>DIQMTQSPSSLS ASVGDRTVITCR ASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLI YAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFAT YYCQQYNIYPYT FGQGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLL NNEFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO: 96)</p>	<p>QVQLQQSGAEV KKPGSSVRVCSK ASGGTFNNAIN WVRQAPGQGLE WMGGIIPMFGT AKYSONFQGRVA ITADESTGTASM ELSSLRSEDVAVY YCARSRDLLLFP HHALSPWGRGT MVTVSSGGGGSK AGIRGIPPKEICLP SDISIDEGKVLTV SAFTGEPTPEVTW STGGRKIHSQEQG RFHIEDSTEDLTLLI SDVOKODGGGLYS LSLGNEFGSDSAT VNIHIRSIDKTHTC PPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVYVD VSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKA KGQPREPQVCTLP PSREEMTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 102)</p>	<p>SSELTQDPAVSV LGQTVRVTCQG DSLRSYASWYQ QKPGQAPVLVIY GKNNRPSGIPDR FSGSSSGNTASLT ITGAQAEDEADY YCSSRDSSGNHW VFGGGTELTVLG GGGSDQPFQSGA PRELTRPLSYVVS VGKDASLSSQIVG NPTPQVSWEKDQ LPVTAGARFRLA QDGDLYRLKILD QLSDSGQYVSRA RNAIGEAFAACVGL EVGAEA (SEQ ID NO: 100)</p>
<p>BU5</p>	<p>Тяжелая цепь B0 (впадина), в которой CH1 заменена на T.14- L1</p>	<p>Легкая цепь B0, в которой CL заменена на O.20- L1</p>	<p>Тяжелая цепь U0 (выступ)</p>	<p>Легкая цепь U0</p>

<p>QVQLQQSGAEV  KKPGSSVRVSCK  ASGGTFNNAIN  WVRQAPGQGLE  WMGGIIPMFGT  AKYSQNFQGRVA  ITADESTGTASM  ELSSLRSED TAVY  YCARSRDLLLFP  HHALSPWGRGT  MVTVSSGGGGS  <u>GIPPKIECLPDISI</u>  <u>DEGKVLTVASAFT</u>  <u>GEPTPEVTWSTG</u>  <u>GRKIHSEQGRFH</u>  <u>IENTDDLTLIIKD</u>  <u>VOKODGGLYTLT</u>  <u>LRNEFGSDSATVN</u>  <u>IHIRSIDKTHTCPP</u>  <u>CPAPEAAGGPSVF</u>  <u>LFPPKPKDTLMIS</u>  <u>RTPEVTCVVVDV</u>  <u>SHEDPEVKFNWY</u>  <u>VDGVEVHNAKTK</u>  <u>PREEQYNSTYRV</u>  <u>VSVLTVLHQDWL</u>  <u>NGKEYKCKVSNK</u>  <u>ALPAPIEKTISKAK</u>  <u>GQPREPQVCTLPP</u>  <u>SREEMTKNQVSL</u>  <u>CAVKGFYPSDLAVE</u>  <u>WESNGOPENNYKT</u>  <u>TPPVLDSDGSFFLV</u>  <u>SKLTVDKSRWQOG</u>  <u>NVFSCSVMHEALH</u>  <u>NHHTQKSLSLSPG</u>  K (SEQ ID NO:  103)</p>	<p>SSELTQDPAVSVA  LGQTVRVTCQG  DSLRSYASWYQ  QKPGQAPVLVIY  GKNNRPSGIPDR  FSGSSSGNTASLT  ITGAQAEDEADY  YCSSRDSSGNHW  VFGGGTELTVLG  <u>GGGSSGAPRFLTR</u>  <u>PLAFVVSVGKDA</u>  <u>TLSSQIVGNPTPO</u>  <u>VSWEKDKQPVTA</u>  <u>GARFRLAQDGD</u>  <u>YRLKILDQLSDS</u>  <u>GOYVSRARNAIG</u>  <u>EAFACLGLQVDA</u>  EA (SEQ ID NO:  104)</p>	<p>EVQLVQSGAEVK  KPGESLKISCKG  SGYSFTTYWLG  WVRQMPGKGL  DWIGIMSPVDS  IRYSPSFQGOVT  MSVDKSITAYL  QWNSLKASDTA  MYYCARRRPGQ  GYDFFWGQGT  VTVSSASTKGPSV  FPLAPSSKSTSGG  TAALGCLVKDYF  PEPVTVSWNSGA  LTSGVHTFPAVLQ  SSGLYSLSSVTV  PSSSLGTQTYICN  VNHKPSNTKVDK  <u>KVEPKSCDKTHT</u>  <u>CPPCPAPEAAGGP</u>  <u>SVFLFPPKPKDTL</u>  <u>MISRTPEVTCVVV</u>  <u>DVSHEDPEVKFN</u>  <u>WYVDGVEVHNA</u>  <u>KTKPREEQYNST</u>  <u>YRVVSVLTVLHQ</u>  <u>DWLNGKEYKCK</u>  <u>VSNKALPAPIEKTI</u>  <u>SKAKGQPREPQV</u>  <u>YTLPPCREEMTKN</u>  <u>QVSLWCLVKGFYP</u>  <u>SDIAVEWESNGQP</u>  <u>ENNYKTPPVLDSD</u>  <u>DGSFFLYSKLTV</u>  <u>KSRWQQGNVFSCS</u>  <u>VMHEALHNHHTQ</u>  <u>KSLSLSPGK</u> (SEQ  ID NO: 95)</p>	<p>DIQMTQSPSSLSA  SVGDRVITICRA  SQGISSWLAWYQ  QKPEKAPKSLIY  AASSLQSGVPSR  FSGSGSGTDFTL  TISSLQPEDFATY  YCQQYNIYPYTF  GOGTKLEIKRTV  AAPSVFIFPPSDEQ  LKSGTASVVCLLN  NFYPREAKVQWK  VDNALQSGNSQE  SVTEQDSKDYSTYS  LSSTLTLSKADYE  <u>KHKVYACEVTHQ</u>  <u>GLSSPVTKSFNRG</u>  EC (SEQ ID NO:  96)</p>
---	--	---	---

Примечание: В последовательности выделенная жирным часть обозначает последовательность варибельной области, сплошная подчеркнутая часть обозначает CH1 или цепь титин-Т, точечная подчеркнутая часть обозначает CH2, курсивная часть обозначает CH3, двойная подчеркнутая часть обозначает цепь CL или цепь обскурин-О, и пунктирная подчеркнутая часть обозначает линкер L1.

Кроме того, было сконструировано биспецифическое антитело FA-1. Биспецифическое антитело FA-1 представляет собой IgG-подобное биспецифическое антитело FA-1, состоящее из тяжелой цепи (модификация по типу выступа в области Fc) и легкой цепи антитела A0, а также тяжелой цепи (модификация по типу впадины в области Fc, замена CH1 на T.10-L1) и легкой цепи (замена CL на O.20-L1) антитела F0 с модифицированным доменом. Последовательности четырех цепей FA-1 показаны в таблице 22 ниже.

Цепь 1 FA-1 (CH1 тяжелой цепи F0 заменен на T.10-L1, и область Fc содержит модификацию по типу выступа):

**QVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFISSAMHWVRQAPGKGLEWVAVI  
SYDGSNKYYVDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSARL  
YASFDYWGGALVTVSSGGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPE  
VTWSTGGRKIHSQEQRFHIENTDDLTLTIKDVQKQDGGGLYTLTLRNEFGSDSA  
TVNIHIRSIDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV  
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYP  
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE  
ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 107)**

Цепь 2 FA-1 (CL легкой цепи F0 заменена на O.20-L1):

**DTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIYN  
TNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES DYYCAIHVDRDIWVFGG  
TKLTVLGGGGSSGAPRFLTRPLAFVVS VGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDKQP  
VTAGARFRLAODGDLYRLKILDQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACLGLQVDAE  
A (SEQ ID NO: 108)**

Цепь 3 FA-1 (тяжелая цепь A0 содержит модификацию по типу выступа):

**EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVA  
RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR  
HGNFGNEYISYWAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC  
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS  
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL  
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTK  
NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGFFLVSKLTVDKSRW  
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 109)**

Цепь 4 FA-1 (легкая цепь A0):

**QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIG  
GTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFG  
GGTKLTVLRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN  
ALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT  
KSFNRGEC (SEQ ID NO: 110)**

Примечание: В приведенных выше последовательностях выделенная жирным часть указывает на последовательность вариабельной области, сплошная подчеркнутая часть указывает на CH1 или цепь титин-Т, точечная подчеркнутая часть указывает на CH2, курсивная часть указывает на CH3, двойная подчеркнутая часть указывает на CL или цепь

обскурин-О, а пунктирная подчеркнутая часть указывает на линкер L1.

## II. Обнаружение биспецифического антитела

DI-1 детектировали с помощью способа, описанного в настоящем описании в тестовом примере 3, и четыре цепи DI-1 совместно трансфицировали в клетки для экспрессии, а затем подвергали масс-спектрометрии. Результаты эксперимента показаны в таблице 22 и фиг. 6А-6С. Результаты масс-спектрометрии показали, что гомодимеры и неправильно спаренные молекулы не были обнаружены, то есть DI-1 был правильно собран.

Таблица 22. Данные масс-спектрометрии для DI-1

Цепь DI-1	Цепь 1 (DI-1-H1)	Цепь 2 (DI-1-L1)	Цепь 3 (DI-1-H2)	Цепь 4 (DI-1-L2)	DI-1-L1 + DI-1-L2 + DI-1-H1 + DI-1-H2	Результаты масс-спектрометрии
Молекулярная масса	49983,82	23487,38	50450,05	22567,45	146488,70	Гомодимеры и неправильно спаренные молекулы не обнаружены

Кроме того, экспрессию BU5 детектировали с помощью способов тестового примера 3 и тестового примера 2 по настоящему изобретению. Во-первых, четыре цепи BU5 совместно трансфицировали в клетки для экспрессии биспецифического антитела, при этом В0 и U0 использовали в качестве контролей. Затем продукт экспрессии подвергали определению чистоты и масс-спектрометрии. Экспериментальные результаты показаны в таблице 23 и фиг. 9А-9С. Экспериментальные результаты показали, что биспецифическое антитело BU5 было успешно экспрессировано, и четыре цепи BU5 были успешно собраны в целевую молекулу без неправильного спаривания. Биспецифическое антитело BU5 имело высокую чистоту с SEC %, равную 88 %.

Таблица 23. Результаты масс-спектрометрии для BU5

Название антитела	Масс-спектрометрия
Контроль В0	✓
Контроль U0	✓
BU5	✓

Примечание: В таблице «✓» указывает на правильное спаривание.

Кроме того, сконструированные биспецифические антитела BU1-BU4 детектировали на чистоту и антигенсвязывающую активность с помощью способов тестового примера 2 и тестового примера 4 по настоящему изобретению. Экспериментальные результаты приведены в таблице 24. Экспериментальные результаты показали, что биспецифическое антитело, в котором был замещен CH1/CL, все еще сохраняло хорошую антигенсвязывающую активность и имело высокую чистоту антитела.

Таблица 24. Результаты определения активности связывания антигена и чистоты антител

Название антитела	Чистота антитела SEC (%)	Связывание антигена EC50 (нМ)	
		Антиген BAFF	Антиген P40
B0	99,05	0,2193	-
U0	99,63	-	0,08881
BU1	95,23	0,3561	0,08397
BU2	91,09	0,4693	0,05674
BU3	83,45	0,4131	0,2238
BU4	91,85	0,5057	0,04429

#### Тестовые примеры

##### Тестовый пример 1: Способ измерения уровня экспрессии антитела

Клетки НЕК293Е трансфицировали экспрессионными плазмидами моноклональных антител или биспецифических антител, и через 6 дней собирали супернатанты экспрессии и центрифугировали при высокой скорости для удаления примесей. Каждый супернатант очищали с использованием колонки с белком А (GE Healthcare). Колонку промывали PBS до тех пор, пока показания A280 не снижались до исходного уровня, и колонку промывали 100 мМ ацетатным буфером (pH 3,5) и нейтрализовали 1 М Tris-HCl, pH 8,0. Уровень экспрессии антитела количественно определяли по количеству антитела/объему экспрессии, полученному при окончательной очистке.

##### Тестовый пример 2: Способ определения чистоты антитела

Чистоту антитела контролировали с помощью SEC-HPLC (эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография). Определение проводили в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора с использованием хроматографа Waters e2695, в котором использовали колонку Waters Xbridge BEH 200A SEC, PBS использовали в качестве подвижной фазы (pH доводили до 6,8 с помощью разбавленной соляной кислоты), вводили

100 мкг белка и проводили градиентное элюирование со скоростью потока 0,5 мл/мин. Чистоту антитела указывали как процент площади пика основного пика к общей площади пика (SEC (%)).

Тестовый пример 3: Способ обнаружения антител с помощью масс-спектрометрии

(I) Получение образца:

1. Определение дегликозилированной интактной молекулярной массы: 30 мкг экспрессированного антитела отбирали и лиофилизировали перед добавлением 10 мкл 8 М Gua-HCl, и смесь денатурировали на водяной бане при 70 °С в течение 10 мин. Добавляли 90 мкл дистиллированной воды, откуда отбирали 30 мкл, добавляли 0,8 мкл фермента PNG F (пептид N-гликозидаза F) и инкубировали смесь на водяной бане при 37 °С в течение 2 ч. Для определения дегликозилированной интактной молекулярной массы отбирали 0,5 мкг продукта.

2. Определение дегликозилированной восстановленной молекулярной массы: 30 мкг экспрессированного антитела отбирали и лиофилизировали перед добавлением 10 мкл 8 М Gua-HCl, и смесь денатурировали на водяной бане при 70 °С в течение 10 мин. Добавляли 90 мкл дистиллированной воды, откуда отбирали 30 мкл, добавляли 0,8 мкл фермента PNG F (пептид N-гликозидаза F) и инкубировали смесь на водяной бане при 37 °С в течение 2 часов. Затем добавляли 2 мкл 0,025 М DTT (дителиотреитол) и смесь восстанавливали в течение 10 минут на водяной бане при 70 °С. Для определения дегликозилированной восстановленной молекулярной массы отбирали 0,5 мкг продукта.

(II) Условия хромато-масс-спектрометрии:

Условия хроматографии:

Хроматографическая колонка: Poroshell 300SB-C8 5 мкм, 2,1×75 мм

Подвижная фаза: А: 0,1% HCOOH/H<sub>2</sub>O В: 0,1% HCOOH/CAN

Температура колонки: 75 °С

Градиент: см. Таблицу 25.

Таблица 25. Градиент хроматографии

Время (мин)	0	5	8	12	12,1	15
В%	5	5	95	95	5	5

Условия масс-спектрометрии:

Масс-спектрометрия: Agilent 6530 Q-TOF ЖХ-МС

Режим ионизации ESI

Режим сбора данных: 1 ГГц (диапазон масс: 500–5000 m/z (масса/заряд))

Температура осушающего газа: 325 °C

Расход осушающего газа: 10 л/мин

Атомизатор: 40 пси (фунт на квадратный дюйм)

Температура защитного газа: 350 °C

Расход защитного газа: 12 л/мин

Напряжение при распылении: 500 В

Капиллярное напряжение: 3500 В

Напряжение при расщеплении: 200 В

Напряжение скиммера: 65 В

Напряжение Rf (радиочастотное): 7500 В

Тестируемое антитело подвергали масс-спектрометрии. Экспериментальные результаты показали, что антитело оставалось правильно собранным после замены CH1/CL на титин-Т/обскурин-О.

Тестовый пример 4: Способ обнаружения связывающей активности антител

Связывающая активность антитела в отношении целевого мембранного белка к антигену может быть обнаружена с помощью FACS (метод анализа сортировки клеток с активированной флуоресценцией). Например, C0, N0, F0, V0 и S0 и их антитела с модифицированным доменом CH1/CL могут быть обнаружены с использованием FACS. Клетки ( $2 \times 10^6$  клеток/мл, 90 мкл), ресуспендированные в буфере FACS (98% PBS, 2% FBS (фетальная бычья сыворотка)), добавляли в 96-луночный планшет с U-образным дном (Corning, 3795) и добавляли 10 мкл антитела, разбавленного в градиенте. Смесь инкубировали при 4 °C в течение 1 часа и дважды промывали буфером FACS, а затем в каждую лунку добавляли Alexa Fluor 488 козье антитело к IgG (H+L) человека (Invitrogen, кат. № 2015982, разведение 1:1000). Смесь инкубировали при 4 °C в течение 1 ч и дважды промывали, а затем клетки ресуспендировали в буфере FACS. Наконец, значения сигнала флуоресценции считывали с использованием FACS CantoII (BD). Наконец, данные обрабатывали и анализировали с использованием FlowJo 7.6 и Graphpad Prism 5.

Для антитела, нацеленного на растворимый белок, связывающую активность антитела в отношении растворимого белка обнаруживали с помощью ELISA. Например, D0, I0, B0, U0, H0, R0 и J0 и их антитела с модифицированным доменом CH1/CL могут быть обнаружены с помощью ELISA. Конкретные процедуры были следующими: белок разбавляли до 1 мкг/мл буфером PBS при pH 7,4 (BasalMedia, B320), добавляли в 96-луночный микропланшет (Corning, 9018) при 100 мкл/лунку и инкубировали при 4 °C в течение ночи. После отбрасывания жидкости в каждую лунку добавляли 300 мкл 5%

обезжиренного молока (BD, 232100), разбавленного PBS, для блокирования, и смесь инкубировали при 37 °С в течение 2 часов. После завершения блокирования блокирующий раствор отбрасывали, и планшет промывали 3 раза буфером PBST (рН 7,4, PBS, содержащий 0,1% твин-20). В каждую лунку добавляли 100 мкл раствора антитела, разбавленного в градиенте, и смесь инкубировали при 37 °С в течение 1 часа. После завершения инкубации планшет промывали 3 раза PBST. В каждую лунку добавляли 100 мкл мышинового антитела к IgG (H+L) человека (Jackson ImmunoResearch, 209-035-088, разведение 1:8000) и инкубировали смесь при 37 °С в течение 1 часа. Планшет промывали 3 раза PBST. В каждую лунку добавляли 100 мкл хромогенного субстрата ТМВ (KPL, 5120-0077) и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 10-15 мин. Реакцию прекращали путем добавления 50 мкл 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в каждую лунку. Значения поглощения при 450 нм считывали на микропланшетном ридере, кривые связывания антител с антигеном строили с помощью программного обеспечения и рассчитывали значения EC<sub>50</sub>.

Антигены, соответствующие антителам в этом тестовом примере, являются следующими: антиген, связывающийся с D0 или его антителом с модифицированным доменом CH1/CL, представляет собой hRANKL (доступный от Sino Biological, 11682-HNCH); антиген, связывающийся с I0 и его антителом с модифицированным доменом CH1/CL, представляет собой hNGF (доступный от Sino Biological, 11050-HNAC); антиген, связывающийся с B0 и его антителом с модифицированным доменом CH1/CL, представляет собой hBAFF (доступный от Sino Biological, 10056-HNCH); антиген, связывающийся с U0 и его антителом с модифицированным доменом CH1/CL, представляет собой hP40 (доступный от Sino Biological, 10052-H08H); антиген, связывающийся с H0 и R0 и их антителами с модифицированными доменами CH1/CL, представляет собой hIL-5 (доступный от R&D systems, 205-IL-025/CF); антиген, связывающийся с J0 и его антителом с модифицированным доменом CH1/CL, представляет собой hTSLP (доступный от Sino Biological, 16135-H08H); антиген, связывающийся с C0 и N0 и их антителами с модифицированным доменом CH1/CL, представляет собой CEA (сверхэкспрессирующие CEA (раково-эмбриональный антиген) клетки MKN45 (клеточная линия рака желудка) (доступные от Nanjing Cbioer, CBP60488)); антиген, связывающийся с F0, V0 и S0 и их антителами с модифицированным доменом CH1/CL, представляет собой B7H3 (сверхэкспрессирующие B7H3 рекомбинантные клеточные линии CT26-B7H3 (CT26 был получен из Клеточного банка Китайской академии, и последовательность B7H3 представлена под номером: XP\_005254757.1)).

Тестовый пример 5: Обнаружение неправильного спаривания антитела с



модифицированным доменом CH1/CL

I. Способ обнаружения экспрессии молекул различных антител с перекрестным неправильным спариванием легкой/тяжелой цепи

В этом эксперименте экспрессию спаривания легкой/тяжелой цепи различных антител анализировали, чтобы убедиться, что замена CH1/CL цепью титин-Т/цепью обскурин-О или цепью титин-Т/цепью обскурин-подобный-О может эффективно уменьшить неправильное спаривание тяжелой/легкой цепи. В частности, когда антитела экспрессировались трансфицированными клетками, тяжелые/легкие цепи D0 и I0 были соответственно обменены (т.е. I/D-1 (тяжелая цепь D0 + легкая цепь I0); I/D-2 (тяжелая цепь I0 + легкая цепь D0)), чтобы определить, будут ли образованы перекрестно неправильно спаренные молекулы из CH1 и CL дикого типа; между тем, тяжелые и легкие цепи антитела D3 с модифицированным доменом, в котором CH1/CL D0 заменен цепью титин-Т/ цепью обскурин-О (CH1 тяжелой цепи D0 была заменена на T.10, а CL легкой цепи была заменена на O.20), и антитела I3 с модифицированным доменом, в котором CH1/CL I0 был заменен цепью титин-Т/цепью обскурин-О (CH1 тяжелой цепи I0 была заменена на T.10, а CL легкой цепи была заменена на O.20), были соответственно обменены для конструирования неправильно спаренных молекул: I/D-3 (тяжелая цепь D0 + легкая цепь I3), I/D-4 (тяжелая цепь D3 + легкая цепь I0), I/D-5 (тяжелая цепь I0 + легкая цепь I3) и I/D-6 (тяжелая цепь I3 + легкая цепь D0). Схематические структурные изображения сконструированных антител показаны на фиг. 7.

Уровень экспрессии антител определяли способом тестового примера 1, и продукты экспрессии подвергали масс-спектрометрии способом тестового примера 3 для определения того, будут ли образовываться неправильно спаренные молекулы. Экспериментальные результаты приведены в таблице 26. Экспериментальные результаты показали, что при совместной экспрессии тяжелая цепь D0 + легкая цепь I0 или тяжелая цепь I0 + легкая цепь D0 могут быть образованы интактные молекулы IgG (150 кДа) с высокими уровнями экспрессии 74,4 мг/л и 73,8 мг/л соответственно; и результаты ЖХ-МС (жидкостная хроматография с масс-спектрометрией) показали, что полученные белки являются неправильно спаренными молекулами IgG, что указывает на то, что если CH1-CL не модифицирован или не заменен, может быть образовано большое количество неправильно спаренных молекул легкой/тяжелая цепь, когда совместно экспрессируются четыре различные тяжелые и легкие цепи биспецифического антитела. После того, как CH1/CL был замещен цепью титин-Т/цепью обскурин-О, не были получены целевые молекулы (150 кДа) в четырех неправильно спаренных формах экспрессии I/D-3 (тяжелая цепь D0 + легкая цепь I3), I/D-4 (тяжелая цепь D3 + легкая цепь I0), I/D-5 (тяжелая цепь I0

+ легкая цепь I3) и I/D-6 (тяжелая цепь I3 + легкая цепь D0), и за исключением комбинации тяжелой цепи D3 и легкой цепи I0, которая образовала небольшое количество молекул ошибки (молекулярная масса составляла 100 кДа) из двух тяжелых цепей, никакие неправильно спаренные молекулы не были получены в других трех формах, что указывает на то, что модифицированные негомологичные пары не могли образовывать неправильно спаренные молекулы в структурной форме IgG. Таким образом, замена CH1-CL цепью титин-Т/цепью обскурин-О позволит эффективно избежать или уменьшить образование негомологичных перекрестно спаренных молекул между легкими/тяжелыми цепями IgG-подобных биспецифических антител.

Таблица 26. Уровень экспрессии и масс-спектрометрия антител с различными перекрестно спаренными легкой/тяжелой цепью

Название неправильного спаривания	Тяжелая цепь	Легкая цепь	Уровень экспрессии антитела (мг/л)	Масс- спектрометрия
I/D-1	Тяжелая цепь D0	Легкая цепь I0	74,4	√
I/D-2	Тяжелая цепь I0	Легкая цепь D0	73,8	√
I/D-3	Тяжелая цепь D0	Легкая цепь I3	0,04	×
I/D-4	Тяжелая цепь D3	Легкая цепь I0	12,75	Только тяжелая цепь, без легкой цепи
I/D-5	Тяжелая цепь I0	Легкая цепь D3	0,04	×
I/D-6	Тяжелая цепь I3	Легкая цепь D0	0,25	×

Примечание: В таблице «√» указывает на то, что была обнаружена неправильно спаренная молекула, а «×» указывает на то, что неправильно спаренная молекула не была обнаружена.

II. Способ обнаружения экспрессии неправильного спаривания легкой/тяжелой цепи биспецифических антител

В этом примере для проверки того, что замена CH1/CL цепью титин-Т/цепью обскурин-О приведет к отсутствию неправильного спаривания или уменьшит неправильное спаривание, были разработаны три формы экспрессии перекрестного спаривания легкой/тяжелой цепи. В частности, две разные тяжелые цепи и одну идентичную VL-CL легкую цепь совместно трансфицировали в клетки для экспрессии антитела, или две разные тяжелые цепи и одну идентичную легкую цепь, в которой CL был заменен цепью обскурин-

О, совместно трансфицировали в клетки для экспрессии антитела, или две разные тяжелые цепи и две разные легкие цепи совместно трансфицировали в клетки для экспрессии антитела (см. Таблицу 27 для конкретных спариваний).

Затем продукт экспрессии подвергали масс-спектрометрии (см. Тестовый пример 3 настоящего изобретения для понимания способа) и детектировали чистоту SEC антитела (см. Тестовый пример 2 настоящего изобретения для понимания способа). Результаты эксперимента приведены в таблице 27. Результаты показали, что правильные молекулы образовывались при совместном добавлении легкой цепи, в которой CL был заменен цепью обскурин-О, и легкой цепи, в которой CL не был заменен, в то время как правильные целевые молекулы не обнаруживались при перекрестном спаривании, когда была добавлена только одна легкая цепь, в которой CL не был заменен, или только одна легкая цепь, в которой CL был заменен цепью обскурин-О. Это указывало на то, что легкая цепь, в которой CL был заменен цепью обскурин-О, более легко связывалась бы с тяжелой цепью, в которой СН1 был заменен цепью титин-Т, с образованием молекулы, но не была бы перекрестно неправильно спарена с тяжелой цепью, в которой СН1 не был заменен цепью титин-Т; легкая цепь, в которой CL не был заменен цепью обскурин-О, более легко связывалась бы с тяжелой цепью, в которой СН1 не был заменен цепью титин-Т, но не связывалась бы с тяжелой цепью, в которой СН1 был заменен цепью титин-Т.

Таблица 27. Результаты обнаружения неправильного спаривания легкой/тяжелой цепи биспецифических антител

Название спаривания	Первая тяжелая цепь (В-Н1)	Вторая тяжелая цепь (В-Н2)	Первая легкая цепь (В-Л1)	Вторая легкая цепь (В-Л2)	Масс-спектрометрия				Чистота антитела SEC (%)	Уровень экспрессии антитела (мг/л)
					В-Н1	В-Н1	В-Н1	В-Н2		
В/У-1	Цепь, образованная заменой СН1 тяжелой цепи В0 на	Тяжелая цепь У0 (с модификацией по типу	Цепь, образованная заменой CL легкой цепи В0 на	Легкая цепь У0	✓	--	--	--	91	25,6

	Т.10 (с модификацией по типу впадины)	выступ а)	О.20							
В/У-2	Тяжелая цепь В0 (с модификацией по типу впадины)	Тяжелая цепь U0 (с модификацией по типу выступа)	Цепь, образующая замену с легкой цепи В0 на О.20	Цепь, образующая замену с легкой цепи В0 на О.20	---	--	--	--	--	0,5
В/У-3	Цепь, образующая замену с тяжелой цепи В0 на Т.10 (с модификацией по типу впадины)	Тяжелая цепь U0 (с модификацией по типу выступа)	Легкая цепь U0	Легкая цепь U0	--	--	--	✓	33	15,6

Примечание: В таблице «✓» указывает на то, что была обнаружена молекула с четырьмя цепями, а «-» указывает на то, что молекула с четырьмя цепями не была обнаружена.

Тестовый пример 6: Обнаружение аффинности биспецифического антитела к антигену

Аффинность тестируемого антитела к белку-антигену определяли с помощью прибора Biacore T200 (GE). Согласно способу, описанному в инструкции набора human anti-capture (GE, кат. № BR-1008-39), для аффинного захвата тестируемого антитела использовали биосенсорный чип с белком А (кат. № 29127556, GE), затем через поверхность чипа пропускали растворимые антигены с серией градиентов концентрации, а для детектирования реакционных сигналов в режиме реального времени использовали прибор Biacore T200, так что получали кривую ассоциация-диссоциации. После завершения диссоциации для каждого цикла биосенсорный чип промывали раствором глицин-соляной кислоты для восстановления (рН 1,5, кат. № BR-1003-54, GE). Данные, полученные в результате эксперимента, приводили в соответствие с использованием программного обеспечения VIAevaluation версии 4.1, GE, с использованием модели Лэнгмюра (1:1) для получения значений аффинности. Экспериментальные результаты приведены в таблице 28.

Экспериментальные результаты показали, что биспецифические антитела с модифицированным доменом по настоящему изобретению полностью сохраняют аффинность двух исходных моноклональных антител к их антигенам. В этом эксперименте были использованы антигены hRANKL (доступный от Sino Biological, 11682-HNCH), hNGF (доступный от Sino Biological, 11050-HNAC), hBAFF (доступный от Sino Biological, 10056-HNCH), hP40 (доступный от Sino Biological, 10052-H08H), hB7H3 (полученный в лаборатории, последовательность представлена в SEQ ID NO: 111) и hCD3 (полученный в лаборатории, гетеродимер, состоящий из  $\delta$ -субъединицы (последовательность представлена в SEQ ID NO: 112) и  $\epsilon$ -субъединицы (последовательность представлена в SEQ ID NO: 113) hCD3).

Таблица 28. Результаты обнаружения аффинности биспецифических антител

Антитело	Антиген	$k_a$ (1/Mc)	$k_d$ (1/c)	KD (M)
B0	hBAFF	1,77E+05	1,52E-04	8,55E-10
U0	hP40	1,44E+06	1,14E-04	7,93E-11
BU5	hBAFF	1,94E+05	7,62E-05	3,93E-10
	hP40	1,54E+06	1,02E-04	6,64E-11
BU1	hBAFF	3,38E+05	1,69E-04	4,99E-10
	hP40	1,38E+06	4,81E-05	3,49E-11

D0	hRANKL	2,36E+04	2,10E-04	8,89E-09
I0	hNGF	1,92E+06	1,19E-04	6,21E-11
DI-1	hRANKL	3,05E+04	9,36E-05	3,06E-09
	hNGF	2,56E+06	8,95E-05	3,50E-11
AO	hCD3	8,01E+04	4,92E-03	6,14E-08
F0	hB7H3	1,57E+05	2,06E-03	1,31E+08
FA-1	hCD3	7,06E+04	4,25E-03	6,02E-08
	hB7H3	1,58E+05	7,12E-03	4,50E+08

Тестовый пример 7: Анализ связывания с антигеном биспецифического антитела с модифицированным доменом CH1/CL

Аффинность тестируемого антитела в отношении белка-антигена определяли с использованием прибора Biacore T200 (GE) для проверки того, что биспецифические антитела с модифицированным доменом CH1-CL по настоящему изобретению могут связываться с двумя антигенами-мишенями одновременно. Конкретные экспериментальные стадии были следующими: биосенсорный чип с белком А (кат. № 29127556, GE) использовали для аффинного захвата антитела BU5, затем молекулу первого антигена hP40 (доступный от Sino biological, 10052-H08H) биспецифического антитела пропускали через поверхность чипа для достижения насыщения, с последующей инъекцией молекулы второго антигена hBAFF (доступный от Sino biological, 10056-HNCH) в определенной концентрации, и инструмент Biacore T200 использовали для обнаружения сигналов реакции в реальном времени, так что была получена кривая ассоциация-диссоциация. После завершения диссоциации для каждого цикла биосенсорный чип промывали раствором глицин-соляной кислоты для восстановления (pH 1,5, кат. № BR-1003-54, GE). Данные приводили в соответствие с программным обеспечением BIAevaluation версии 4.1, GE с использованием модели Ленгмюра (1:1). Затем использовали биосенсорный чип белка А (кат. № 29127556, GE) для аффинного захвата антитела BU5, затем молекулу первого антигена hP40 (доступную от Sino biological, 10052-H08H) биспецифического антитела пропускали через поверхность чипа для достижения насыщения, с последующей инъекцией молекулы второго антигена hBAFF (доступной от Sino biological, 10056-HNCH) в определенной концентрации, и инструмент Biacore T200 использовали для обнаружения сигналов реакции в реальном времени, так что получали кривую ассоциация-диссоциация. После завершения диссоциации для каждого цикла биосенсорный чип промывали раствором глицин-соляной кислоты для восстановления

(pH 1,5, кат. № BR-1003-54, GE). Данные приводили в соответствие с помощью программного обеспечения VIAevaluation версии 4.1, GE, с использованием модели Ленгмюра (1:1).

Экспериментальные результаты приведены в таблице 29. Экспериментальные результаты показали, что биспецифическое антитело BU5 может продолжать связываться с антигеном hBAFF после связывания с антигеном hP40 для достижения насыщения, и имеет способность повторно связываться с hBAFF, сопоставимую с моноклональным антителом B0. Аналогичным образом, биспецифическое антитело BU5 может продолжать связываться с антигеном hP40 после связывания с антигеном hBAFF для достижения насыщения и обладает способностью повторно связываться с hP40, сравнимой с U0. Это указывает на то, что биспецифические антитела, в которых CH1/CL заменен цепью титин-Т/цепью обскурин-О по настоящему изобретению, могут связываться с двумя антигенами-мишенями одновременно.

Таблица 29. Результаты обнаружения аффинности антител

Антитело	Антиген пропускали через поверхность чипа	Данные определения аффинности			
		Антиген	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
Bmab	hBAFF	hBAFF	1,77E+05	1,53E-04	8,64E-10
Umab	hP40	hP40	1,59E+06	1,09E-04	6,89E-11
BU5	Инъекция hBAFF для связывания для достижения насыщения, с последующей инъекцией антигена hP40	hP40	1,57E +06	1,04E-04	6,61E-11
	Инъекция hP40 для связывания для достижения насыщения, с последующей инъекцией антигена hBAFF	hBAFF	1,57E+05	8,44E-05	5,37E-10

Тестовый пример 8: Эксперимент по дифференцировке остеокластов для биспецифического антитела DI-1

Клетки Raw264.7 (Клеточный банк Китайской академии, SCSP-5036) расщепляли и ресуспендировали для подсчета. Клетки высевали в 24-луночный планшет для культивирования клеток (Corning, 3524) и культивировали в инкубаторе клеток при 37 °C в

течение ночи. На следующий день раствор антитела разбавляли до различных концентраций и гомогенно смешивали с RANKL (Sino biological, 11682-HNCH), и смесь добавляли в планшет для культивирования клеток с получением конечной концентрации 50 нг/мл и культивировали при 37 °С. Через 96 ч раствор в 24-луночном планшете удаляли, в каждую лунку добавляли 100 мкл буфера для лизиса клеток (Beuyotime, P0013J), и смесь пипетировали и гомогенно перемешивали. Лизат переносили в пробирку EP и центрифугировали при 12000 g в течение 5 минут, и супернатант отбирали для детектирования с использованием набора для анализа на фосфатазу винной кислоты (Beuyotime, P0332) в соответствии со способом, описанным в инструкциях. Значения поглощения при 405 нм считывали на микропланшетном ридере. Определенные значения приводили в соответствие с помощью программного обеспечения для получения кривой, и рассчитывали значения IC<sub>50</sub>. Экспериментальные результаты показаны на фиг. 10. Экспериментальные результаты показали, что биспецифическое антитело DI-1, в котором CH1/CL заменен, сохраняет хорошую активность и эффективно ингибирует дифференцировку остеокластов.

Тестовый пример 9: Эксперимент по пролиферации клеток TF1 для биспецифического антитела DI-1

Активность антитела на клеточном уровне оценивали в эксперименте по пролиферации клеток TF-1, индуцированных NGF (фактор роста нервов) (ATCC, CRL-2003). Экспериментальные процедуры были следующими: клетки TF1 расщепляли и собирали, ресуспендировали для подсчета, высевали в 96-луночный планшет (Corning, 3903) и культивировали в инкубаторе при 37 °С в течение ночи. На следующий день раствор антитела разбавляли до различных концентраций и гомогенно смешивали с NGF (Sino biological, 11050-HNAC), и смесь добавляли в планшет для культивирования клеток с получением конечной концентрации 10 нг/мл и культивировали в инкубаторе. Через 72 ч планшет для культивирования клеток удаляли, 50 мкл раствора для анализа Cell-titer Glo (Promega, G755B) добавляли в каждую лунку, смесь инкубировали на шейкере в течение 10 мин и оставляли стоять при комнатной температуре в течение 10 мин. Сигналы люминесценции обнаруживали с помощью микропланшетного ридера (PerkinElmer, Victor 3). Значения определенных сигналов приводили в соответствие с помощью программного обеспечения для получения кривой, и рассчитывали значения IC<sub>50</sub>. Результаты эксперимента показаны на фиг. 11. Результаты эксперимента показали, что биспецифическое антитело DI-1, в котором был заменен CH1/CL, обладало хорошей активностью.



Тестовый пример 10: Обнаружение неправильного спаривания легкой и тяжелой цепей биспецифического антитела, в котором заменен CH1/CL

Следующие эксперименты проводили для анализа неправильного спаривания легкой и тяжелой цепей биспецифических антител, в которых CH1/CL заменяли цепью титин-Т/цепью обскурин-О или TCR $\alpha$ /TCR $\beta$ . Конкретные эксперименты были следующими:

I. Эксперимент по неправильному спариванию легкой и тяжелой цепей при совместной экспрессии четырех цепей биспецифического антитела

Биспецифические антитела HJ-1 и HJ-2, каждое из которых состояло из четырех цепей, конструировали путем замены CH1/CL H0 или J1 на TCR $\alpha$ /TCR $\beta$ , и биспецифические антитела HJ-3 и HJ-4, каждое из которых состояло из четырех цепей, конструировали путем замены CH1/CL H0 или J1 на цепь титин-Т/цепь обскурин-О. Схематические структурные изображения биспецифических антител показаны на фиг. 12, и полноразмерные последовательности биспецифических антител показаны в таблице 30:

Таблица 30. Перечень последовательностей биспецифических антител

Биспецифическое антитело №	Последовательности четырех цепей биспецифического антитела HJ			
	Цепь 1	Цепь 3	Цепь 2	Цепь 4
HJ-1	Тяжелая цепь H0 (выступ), в которой CH1 заменена на TCR $\beta$	Легкая цепь H0, в которой CL заменена на TCR $\alpha$	Тяжелая цепь J1 (впадина)	Легкая цепь J1

	<p>HJ-1-H1:  <u>EVOLVESGGGLV</u>  <u>QPGGSLRLSCAAS</u>  <u>GFTFSHYMAWV</u>  <u>ROAPGKGLEWVT</u>  <u>SISYEGDITYYGD</u>  <u>SVKGRFTISRDN</u>  <u>KNTLYLQMNSLR</u>  <u>AEDTATYYCASQ</u>  <u>TLRESFDYWGOQ</u>  <u>TLTVSSLEDLK</u>  <u>NVFPPEVAVFEPS</u>  <u>EAEISHTQKATL</u>  <u>VCLATGFYPDHV</u>  <u>ELSWVWNGKEV</u>  <u>HSGVCTDPQPLK</u>  <u>EQPALQDSRYAL</u>  <u>SSRLRVSATFWQ</u>  <u>NPRNHFRQVQV</u>  <u>FYGLSENDEWT</u>  <u>QDRAKPVTVQIVS</u>  <u>AEAWGRASDKT</u>  <u>HTCPPCPAPEAAG</u>  <u>GPSVFLFPPKPKD</u>  <u>TLMISRTPEVTCV</u>  <u>VVDVSHEDPEVK</u>  <u>FNWYVDGVEVH</u>  <u>NAKTKPREEQYN</u>  <u>STYRVVSVLTVLH</u>  <u>QDWLNGKEYKC</u>  <u>KVSNKALPAPIEK</u>  <u>TISKAKGQPREPQ</u>  <u>VYTLPPCREEMT</u>  <u>KNQVSLWCLVKG</u>  <u>FYPSDIAVEWESN</u>  <u>GPENNYKTPPV</u>  <u>VLDSGDFFLYSK</u>  <u>LVDKSRWQOGN</u>  <u>VFSCVMHEALH</u>  <u>NHYTQKSLSLSPG</u>  <u>KHHHHH</u> (SEQ  ID NO: 114)</p>	<p>HJ-1-L1:  <u>DIQMTQSPSSVSA</u>  <u>SVGDRVITICRAS</u>  <u>QDIANYLSWYQQ</u>  <u>KPGKSPKLLIYGT</u>  <u>SNLEVGVPSTRFSG</u>  <u>SRSQTDFTLTSSL</u>  <u>QPEDFATYYCLOD</u>  <u>KEFPRTFGGGTKV</u>  <u>EIKKPDIQNPDP</u>  <u>VYQLRDSKSSDK</u>  <u>SVCLFTDFDSQT</u>  <u>QVSQSKDSVYI</u>  <u>TDKCVLDMRSM</u>  <u>DFKSNSAVAWSQ</u>  <u>KSDFACANAFQN</u>  <u>SIIPEDTFFSPES</u>  S (SEQ ID NO: 115)</p>	<p>HJ-1-H2:  <u>EVQLVQSGAEVK</u>  <u>KPGSSVKVSCKA</u>  <u>SGYTFSNYLIEWV</u>  <u>ROAPGOGLEWIG</u>  <u>VIDPGVGDITNIN</u>  <u>ENFKGRATLTADK</u>  <u>STSTAYIELSSLRS</u>  <u>EDTAVYYCARED</u>  <u>NTGIAFDYWGQG</u>  <u>ITVTVSSASTKGP</u>  <u>SVFPLAPSSKSTS</u>  <u>GGTAAALGCLVKD</u>  <u>YFPEPVTVSWNS</u>  <u>GALTSQVHTFPAV</u>  <u>LQSSGLYSLSSVV</u>  <u>TVPSSSLGTQTYI</u>  <u>CNVNHKPSNTKV</u>  <u>DKKVEPKSCDKT</u>  <u>HTCPPCPAPEAAG</u>  <u>GPSVFLFPPKPKD</u>  <u>TLMISRTPEVTCV</u>  <u>VVDVSHEDPEVK</u>  <u>FNWYVDGVEVH</u>  <u>NAKTKPREEQYN</u>  <u>STYRVVSVLTVLH</u>  <u>QDWLNGKEYKC</u>  <u>KVSNKALPAPIEK</u>  <u>TISKAKGQPREPQ</u>  <u>VCTLPPSREEMTK</u>  <u>NOVSLSCAVKGF</u>  <u>YPSDIAVEWESNG</u>  <u>QPENNYKTPPV</u>  <u>DSDGDFFLYSKLT</u>  <u>VDKSRWQOGNVF</u>  <u>SCSVMHEALHNN</u>  <u>YTQKSLSLSPGKD</u>  <u>YKDDDDK</u> (SEQ  ID NO: 116)</p>	<p>HJ-1-L2:  <u>SIVMTQTPLSLSV</u>  <u>TPGQPASISCKAS</u>  <u>OSVSSDVTWYLO</u>  <u>KPGOSPQLLIYYV</u>  <u>SEHYTGVPDRFSG</u>  <u>SGYGTDFTLKISR</u>  <u>VEAEDVGVVYCYQ</u>  <u>QHHRFPLTFGOGT</u>  <u>KLEIKRTVAAPSV</u>  <u>FIFPPSDEQLKSGT</u>  <u>ASVVCLLNRFYP</u>  <u>REAKVQWKVDN</u>  <u>ALQSGNSQESVTE</u>  <u>QDSKSTYLSLST</u>  <u>LTLSKADYEKHK</u>  <u>VYACEVTHQGLS</u>  <u>SPVTKSFNRGEC</u>  (S (SEQ ID NO: 117)</p>
HJ-2	Тяжелая цепь H0 (впадина)	Легкая цепь H0	Тяжелая цепь J1 (выступ), в которой CH1 заменена на TCR $\beta$	Легкая цепь J1, в которой CL заменена на TCR $\alpha$

	<p>HJ-2-H1:  <u>EVQLVESGGGLV</u>  <u>QPGGSLRLSCAAS</u>  <u>GFTFSHYMAWV</u>  <u>ROAPGKGLEWVT</u>  <u>SISYEGDITYYGD</u>  <u>SVKGRFTISRDN</u>  <u>KNTLYLQMNSLR</u>  <u>AEDTATYYCASQ</u>  <u>TLRESFDYWGGQ</u>  <u>TLVTVSSASTKGP</u>  <u>SVFPLAPSSKSTS</u>  <u>GGTAALGCLVKD</u>  <u>YFPEPVTVSWNS</u>  <u>GALTSQVHTFPAV</u>  <u>LQSSGLYSLSSV</u>  <u>TVSSSLGTQTYI</u>  <u>CNVNHNKPSNTKV</u>  <u>DKKVEPKSCDKT</u>  <u>HTCPPCPAPEAAG</u>  <u>GPSVFLFPPKPKD</u>  <u>TLMISRTPEVTCV</u>  <u>VVDVSHEDPEVK</u>  <u>FNWYVDGVEVH</u>  <u>NAKTKPREEQYN</u>  <u>STYRVVSVLTVLH</u>  <u>QDWLNGKEYKC</u>  <u>KVSNKALPAPIEK</u>  <u>TISKAKGQPREPQ</u>  <u>VCTLPPSREEMTK</u>  <u>NOVSLSCAVKGF</u>  <u>YPSDIAVEWESNG</u>  <u>QPENNYKTTTPVL</u>  <u>DSDGSFFLVSKLT</u>  <u>YDKSRWQQGNVF</u>  <u>SCSYMHEALHNNH</u>  <u>YTQKSLSLSPGKD</u>  <u>YKDDDDK (SEQ</u>  <u>ID NO: 118)</u></p>	<p>HJ-2-L1:  <u>DIQMTQSPSSVSA</u>  <u>SVGDRVITICRAS</u>  <u>QDIANYLSWYQQ</u>  <u>KPGKSPKLLIYGT</u>  <u>SNLEVGVPSPRFSG</u>  <u>SRSQTDFTLTISSL</u>  <u>QPEDFATYYCLOD</u>  <u>KEFPRTFGGGTKV</u>  <u>EIKRTVAAPSVEIF</u>  <u>PPSDEQLKSGIAS</u>  <u>VVCLLNNFYPRE</u>  <u>AKVQWKVDNAL</u>  <u>QSGNSQESVTEQ</u>  <u>DSKDSTYSLSSL</u>  <u>TLISKADYEKHKV</u>  <u>YACEVTHQGLSSP</u>  <u>VTKSFNRGEC</u>  <u>(SEQ ID NO: 119)</u></p>	<p>HJ-1-H2:  <u>EVQLVQSGAEVK</u>  <u>KPGSSVKVSCKA</u>  <u>SGYTFSNYLIEWV</u>  <u>ROAPGOGLEWIG</u>  <u>VIDPGVGDINYN</u>  <u>ENFKGRATLTADK</u>  <u>STSTAYIELSSLRS</u>  <u>EDTAVYYCARED</u>  <u>NTGTAFDYWGQG</u>  <u>TTVTVSSLEDLK</u>  <u>NVFPPEVAVFEPS</u>  <u>EAEISHTQKATL</u>  <u>VCLATGFYPDHV</u>  <u>ELSWVWNGKEV</u>  <u>HSGVCTDPQPLK</u>  <u>EQPALQDSRYAL</u>  <u>SSRLRVSATFWQ</u>  <u>NPRNHFRQCQVQ</u>  <u>FYGLSENDEWT</u>  <u>QDRAKPVTQIVS</u>  <u>AEAWGRASDKT</u>  <u>HTCPPCPAPEAAG</u>  <u>GPSVFLFPPKPKD</u>  <u>TLMISRTPEVTCV</u>  <u>VVDVSHEDPEVK</u>  <u>FNWYVDGVEVH</u>  <u>NAKTKPREEQYN</u>  <u>STYRVVSVLTVLH</u>  <u>QDWLNGKEYKC</u>  <u>KVSNKALPAPIEK</u>  <u>TISKAKGQPREPQ</u>  <u>VYTLPPCREEMT</u>  <u>KNQVSLWCLVKG</u>  <u>FYPSDIAVEWESN</u>  <u>GQPENNYKTTTP</u>  <u>VLDSDGSFFLYSK</u>  <u>LTVDKSRWQQGN</u>  <u>VFSCSYMHEALH</u>  <u>NHYTQKSLSLSPG</u>  <u>KHHNNHH (SEQ</u>  <u>ID NO: 120)</u></p>	<p>HJ-2-L2:  <u>SIVMTQTPLSLSV</u>  <u>TPGQPASISCKAS</u>  <u>QSVSSDVTWYLO</u>  <u>KPGOSPOLLIIYV</u>  <u>SEHYTGVPDRFSG</u>  <u>SGYGTDFTLKISR</u>  <u>VEAEDVGVYYCQ</u>  <u>QHHRFPLTFGOGT</u>  <u>KLEIKKPDIQNPD</u>  <u>PAVYQLRDSKSS</u>  <u>DKSVCLFTDFDS</u>  <u>QTQVSQSKDSDV</u>  <u>YITDKCVLDMRS</u>  <u>MDFKSNSAVAWS</u>  <u>QKSDFACANAFQ</u>  <u>NSIIPEDTFFPSPE</u>  <u>SS (SEQ ID NO:</u>  <u>121)</u></p>
HJ-3	Тяжелая цепь (выступ) H0, в которой CH1 заменена на T.10-L1	Легкая цепь H0, в которой CL заменена на O.20-L1	Тяжелая цепь J1 (впадина)	Легкая цепь J1

	<p>HJ-3-H1:  <u>EVQLVESGGGLV</u>  <u>QPGGSLRLSCAAS</u>  <u>GFTFSHYMAWV</u>  <u>ROAPGKGLEWVT</u>  <u>SISYEGDITYYGD</u>  <u>SVKGRFTISRDN</u>  <u>KNTLYLOMNSLR</u>  <u>AEDTATYYCASQ</u>  <u>TLRESFDYWGQG</u>  <u>TLVTVSSGGGGS</u>  <u>GIPPKIECLPIDIS</u>  <u>IDEGKVLTVASA</u>  <u>FTGEPTPEVTWS</u>  <u>TGGRKIHSQEQG</u>  <u>RFHIENTDDLT</u>  <u>LIHKDVQKQDGG</u>  <u>LYTLTLRNEFGS</u>  <u>DSATVNIHRSID</u>  <u>KTHTCPPCPAPEA</u>  <u>AGGPSVLEFPKPK</u>  <u>KDTLMISRTPEVT</u>  <u>CVVVDVSHEDPE</u>  <u>VKFNWYVDGVE</u>  <u>VHNAKTKPREEQ</u>  <u>YNSTYRVVSVLT</u>  <u>VLHQDWLNGKE</u>  <u>YKCKVSNKALPA</u>  <u>PIEKTISKAKGQP</u>  <u>REPOVYTLPPCRE</u>  <u>EMTKNQVSLWCL</u>  <u>YKGFYPSDIAVEW</u>  <u>ESNGOPENNYKT</u>  <u>TPPVLDSDGSFEL</u>  <u>YSKLTVDKSRWQ</u>  <u>QGNVFSCSVMHE</u>  <u>ALHNHYTQKSLS</u>  <u>LSPGKHHHHHH</u>          (SEQ ID NO: 122)</p>	<p>HJ-3-L1:  <u>DIQMTQSPSSVSA</u>  <u>SVGDRVITICRAS</u>  <u>QDIANYLSWYQQ</u>  <u>KPGKSPKLLIYGT</u>  <u>SNLEVGVPSTRFSG</u>  <u>SRSQTDFLTISL</u>  <u>QPEDFATYYCLOD</u>  <u>KEFPRTFGGGTKV</u>  <u>EIKGGGGSSGAP</u>  <u>RFLTRPLAFVVS</u>  <u>VGKDATLSSQIV</u>  <u>GNPTPQVSWEK</u>  <u>DKQPVTAGARFR</u>  <u>LAQDGDLYRLKI</u>  <u>LDLQLSDSGQYV</u>  <u>SRARNAIGEAEA</u>  <u>CLGLQVDAEA</u>          (SEQ ID NO: 123)</p>	<p>HJ-3-H2:  <u>EVQLVQSGAEVK</u>  <u>KPGSSVKVSCKA</u>  <u>SGYTFSNYLIEWV</u>  <u>ROAPGQGLEWIG</u>  <u>VIDPGVGDITNYN</u>  <u>ENFKGRATLTADK</u>  <u>STSTAYIELSSLRS</u>  <u>EDTAVYYCARED</u>  <u>NTGTAFDYWGQG</u>  <u>ITVTVSSASTKGP</u>  <u>SVFPLAPSSKSTS</u>  <u>GGTAALGCLVKD</u>  <u>YFPEPVTVSWNS</u>  <u>GALTSQVHTFPAV</u>  <u>LQSSGLYSLSSVV</u>  <u>TVPSSSLGTQTYI</u>  <u>CNVNHKPSNTKV</u>  <u>DKKVEPKSCDKT</u>  <u>HTCPPCPAPEAAG</u>  <u>GPSVLEFPKPKD</u>  <u>TLMISRTPEVTCV</u>  <u>VVDVSHEDPEVK</u>  <u>FNWYVDGVEVH</u>  <u>NAKTKPREEQYN</u>  <u>STYRVVSVLTVLH</u>  <u>QDWLNGKEYKC</u>  <u>KVSNKALPAPIEK</u>  <u>TISKAKGQPREPQ</u>  <u>VCTLPPSREEMTK</u>  <u>NQVSLSCAVKGF</u>  <u>YPSDIAVEWESNG</u>  <u>OPENNYKTTPPVL</u>  <u>DSDGSFELVSKLT</u>  <u>VDKSRWQGNVVF</u>  <u>SCSVMHEALHNH</u>  <u>YTQKSLSLSPGKD</u>  <u>YKDDDDK</u> (SEQ          ID NO: 116)</p>	<p>HJ-3-L2:  <u>SIVMTQTPLSLSV</u>  <u>TPGQPASISCKAS</u>  <u>QSVSSDVTWYLO</u>  <u>KPGQSPQLLIYYV</u>  <u>SEHYTGVDPDRFSG</u>  <u>SGYGTDFTLKISR</u>  <u>VEAEDVGVYYCQ</u>  <u>QHHRFPLTFGQGT</u>  <u>KLEIKRTVAAPSV</u>  <u>FIFPPSDEQLKSGT</u>  <u>ASVVCLLNNEFYP</u>  <u>REAKVQWKVDN</u>  <u>ALQSGNSQESVTE</u>  <u>QDSKDSYSLSSST</u>  <u>LTLSKADYEKHK</u>  <u>VYACEVTHQGLS</u>  <u>SPVTKSFNRGEC</u>          (SEQ ID NO: 117)</p>
HJ-4	Тяжелая цепь H0 (впадина)	Легкая цепь H0	Тяжелая цепь (выступ) J1, в которой CH1 заменена на T.10-L1	Легкая цепь J1, в которой CL заменена на O.20-L1

	<p>HJ-4-H1:  <u>EVQLVESGGGLV</u>  <u>QPGGSLRLSCAAS</u>  <u>GFTFSHYMAWV</u>  <u>ROAPGKGLEWVT</u>  <u>SISYEGDITYYGD</u>  <u>SVKGRFTISRDN</u>  <u>KNTLYLQMNLSR</u>  <u>AEDTATYYCASQ</u>  <u>TLRESFDYWGOQ</u>  <u>TLVTVSSASTKGP</u>  <u>SVFPLAPSSKSTS</u>  <u>GGTAALGCLVKD</u>  <u>YFPEPVTVSWNS</u>  <u>GALTSQVHTFPAV</u>  <u>LQSSGLYSLSSVV</u>  <u>TVPSSSLGTQTYI</u>  <u>CNVNHKPSNTKV</u>  <u>DKKVEPKSCDKT</u>  <u>HTCPPCPAPEAAG</u>  <u>GPSVFLFPPKPKD</u>  <u>TLMISRTPEVTCV</u>  <u>YVDVSHEDPEVK</u>  <u>FNWYVDGVEVH</u>  <u>NAKTKPREEQYN</u>  <u>STYRVVSVLTVLH</u>  <u>QDWLNGKEYKC</u>  <u>KVSNKALPAPIEK</u>  <u>TISKAKGQPREPQ</u>  <u>VCTLPPSREEMTK</u>  <u>NQVSLSCAVKGF</u>  <u>YPSDIAVEWESNG</u>  <u>QPENNYKTPPVVL</u>  <u>DSDGSFFLVSKLT</u>  <u>VDKSRWQQGNVF</u>  <u>SCSYMHEALHNH</u>  <u>YTQKSLSLSPGKD</u>  <u>YKDDDDK</u> (SEQ  ID NO: 118)</p>	<p>HJ-4-L1:  <u>DIQMTQSPSSVSA</u>  <u>SVGDRVTITCRAS</u>  <u>QDIANYLSWYQQ</u>  <u>KPGKSPKLLIYGT</u>  <u>SNLEVGVPSTRFSG</u>  <u>SRSQTDFTLTISSL</u>  <u>QPEDFATYYCLOD</u>  <u>KEFPRTFGGGTKV</u>  <u>EIKRTVAAPSVFIF</u>  <u>PPSDEQLKSGTAS</u>  <u>VVCLLNNFYPRE</u>  <u>AKVQWKVDNAL</u>  <u>QSGNSQESVTEQ</u>  <u>DSK DSTYLSSTL</u>  <u>TLSKADYEKHKV</u>  <u>YACEVTHQGLSSP</u>  <u>VTKSFNRGEC</u>  (SEQ ID NO: 119)</p>	<p>HJ-4-H2:  <u>EVQLVQSGAEVK</u>  <u>KPGSSVKVSCKA</u>  <u>SGYTFSNYLIEWV</u>  <u>ROAPGQGLEWIG</u>  <u>VIDPGVGDITNIN</u>  <u>ENFKGRATLTADK</u>  <u>STSTAYIELSSLRS</u>  <u>EDTAVYYCARED</u>  <u>NTGTAFDYWGQG</u>  <u>TTVTVSSGGGGS</u>  <u>GIPPKIECLPIDIS</u>  <u>IDEGKVLTVASA</u>  <u>FTGEPTPEVTWS</u>  <u>TGGRKIHSEQEQG</u>  <u>RFHIENTDDLTT</u>  <u>LIKDVQKQDGG</u>  <u>LYTLTLRNEFGS</u>  <u>DSATVNIHIRSID</u>  <u>KTHTCPPCPAPEA</u>  <u>AGGPSVFLFPPKP</u>  <u>KDTLMISRTPEVT</u>  <u>CVVVDVSHEDPE</u>  <u>VKFNWYVDGVE</u>  <u>VHNAKTKPREEQ</u>  <u>YNSTYRVVSVLT</u>  <u>VLHQDWLNGKE</u>  <u>YKCKVSNKALPA</u>  <u>PIEKTISKAKGQP</u>  <u>REPQVYTLPPCRE</u>  <u>EMTKNQVSLWCL</u>  <u>VKGFYPSDIAVEW</u>  <u>ESNGQPENNYKT</u>  <u>TPPVLDSDGSFEL</u>  <u>YSKLTVDKSRWQ</u>  <u>QGNVFSCSYMHE</u>  <u>ALHNHYTQKSLS</u>  <u>LSPGKHHHHHH</u>  (SEQ ID NO: 124)</p>	<p>HJ-4-L2:  <u>SIVMTOTPLSLSV</u>  <u>TPGQPASISCKAS</u>  <u>QSVSSDVTWYLO</u>  <u>KPGQSPQLLIYYV</u>  <u>SEHYTGVDPDRFSG</u>  <u>SGYGTDFTLKISR</u>  <u>VEAEDVGVYYCQ</u>  <u>QHHRFPLTFGOGT</u>  <u>KLEIKGGGGSSG</u>  <u>APRFLTRPLAFV</u>  <u>YVSGKDATLSSQ</u>  <u>IVGNPTPOVSWE</u>  <u>KDKOPVTAGAR</u>  <u>FRLAODGDLYRL</u>  <u>KILDLOLSDSGO</u>  <u>YVSRARNAIGEA</u>  <u>FACLGLQVDAEA</u>  (SEQ ID NO: 125)</p>
--	--	---	--	--

Примечание. В последовательностях выделенная жирным часть указывает на часть цепи титин-Т/цепи обскурин-О в последовательности TCR, точечная подчеркнутая часть указывает на Fc или часть константной области CL, сплошная подчеркнутая часть указывает на часть вариабельной области, и пунктирная подчеркнутая часть указывает на линкер L1.

Тяжелая цепь J1:

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSNYLIEWVRQAPGQGLEWIGVIDP  
GVGDTNYNENFKGRATLTADKSTSTAYIELSSLRSEDVAVYYCAREDNTGTAFD  
YWGQGTITVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN  
SGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDK  
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVDVSHE  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS  
DIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVM  
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO:126)

Легкая цепь J1:

SIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSVSSDVTWYLOKPGQSPQLLIYYVSEHY  
TGVPDRFSGSGYGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQHHRFPLTFGQGTKLEIKRT  
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALOSGNSQESV  
TEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 117).

Варибельная область тяжелой цепи J1:

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSNYLIEWVRQAPGQGLEWIGVIDP  
GVGDTNYNENFKGRATLTADKSTSTAYIELSSLRSEDVAVYYCAREDNTGTAFD  
YWGQGTITVTVSS

(SEQ ID NO: 171).

Варибельная область легкой цепи J1:

SIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSVSSDVTWYLOKPGQSPQLLIYYVSEHY  
TGVPDRFSGSGYGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQHHRFPLTFGQGTKLEIK

(SEQ ID NO: 172).

Четыре цепи HJ-1, HJ-2, HJ-3 и HJ-4 совместно трансфицировали в клетки для экспрессии, а затем продукты экспрессии подвергали масс-спектрометрии (см. тестовый пример 3 настоящего изобретения для понимания способа), чтобы определить, существуют ли молекулы с неправильно спаренными легкой и тяжелой цепями. Экспериментальные результаты показаны на фиг. 13A-13D и в таблице 31.

Таблица 31. Экспериментальные результаты масс-спектрометрии продуктов экспрессии биспецифических антител

Биспецифическое антитело №	Совместно трансфицированные	Результаты масс-спектрометрии		
		HJ	Неправильно	Неправильно

	цепи	(1+2+3+4)	спаренная молекула 1 (1+2+3+3)	спаренная молекула 2 (1+2+4+4)
HJ-1	1: HJ-1-H1	√	×	√
	2: HJ-1-H2			
	3: HJ-1-L1			
	4: HJ-1-L2			
HJ-2	1: HJ-2-H2	√	×	√
	2: HJ-2-H1			
	3: HJ-2-L2			
	4: HJ-2-L1			
HJ-3	1: HJ-3-H1	√	×	×
	2: HJ-3-H2			
	3: HJ-3-L1			
	4: HJ-3-L2			
HJ-4	1: HJ-4-H2	√	×	×
	2: HJ-4-H1			
	3: HJ-4-L2			
	4: HJ-4-L1			

Примечание: В таблице «√» указывает на то, что молекула была обнаружена, «×» указывает на то, что молекула не была обнаружена, «HJ (1 + 2 + 3 + 4)» указывает на биспецифическое антитело, образованное четырьмя соответствующими цепями, пронумерованными 1, 2, 3 и 4, с его левой стороны, «неправильно спаренная молекула 1 (1 + 2 + 3 + 3)» указывает на неправильно спаренную молекулу 1, образованную четырьмя соответствующими цепями, пронумерованными 1, 2, 3 и 3, с его левой стороны; и «неправильно спаренная молекула 2 (1 + 2 + 4 + 4)» указывает на неправильно спаренную молекулу 2, образованную четырьмя соответствующими цепями, пронумерованными 1, 2, 4 и 4, с его левой стороны.

Экспериментальные результаты показали, что, когда четыре цепи биспецифического антитела, в котором CH1/CL заменен TCRβ/TCRα, были совместно трансфицированы для экспрессии, легкая и тяжелая цепи антитела были неправильно спарены. Однако биспецифическое антитело, в котором CH1/CL заменен цепью титин-Т/цепью обскурин-О,

не имело неправильного спаривания легкой и тяжелой цепей. Это указывает на то, что биспецифические антитела, в которых CH1/CL заменен цепью титин-Т/цепью обскурин-О, по настоящему изобретению обладают превосходной способностью уменьшать неправильное спаривание легкой и тяжелой цепей.

II. Эксперимент с биспецифическими антителами с совместной экспрессией трех цепей

В этом эксперименте три цепи (1 тяжелая цепь, в которой CH1 была заменена TCR $\beta$  или цепью титин-Т, 1 тяжелая цепь, в которой CH1 не была заменена, и 1 легкая цепь дикого типа (VL-CL), в которой CL не была заменена; конкретные последовательности показаны в таблице 30) совместно трансфицировали в клетки для экспрессии, продукты экспрессии подвергали масс-спектрометрии (см. тестовый пример 3 настоящего изобретения для понимания способа) и определяли чистоту SEC антитела (см. тестовый пример 2 настоящего изобретения для понимания способа), чтобы проверить, будет ли легкая цепь дикого типа (VL-CL) образовывать неправильно спаренную молекулу в комбинации с тяжелой цепью, в которой CH1 была заменена TCR $\beta$  или цепью титин-Т. Экспериментальные результаты показаны на фиг. 14А, фиг. 14В, фиг. 15А, фиг. 15В и в таблице 32.

Таблица 32. Экспериментальные результаты для биспецифических антител с совместной экспрессией трех цепей

Группа	Совместно трансфицированные цепи	Чистота SEC (%) антитела	Результаты масс-спектрометрии	
			Молекула (1+2+3)	Неправильно спаренная молекула (1+2+3+3)
1	1: HJ-1-H1	75,85	√	√
	2: HJ-1-H2			
	3: HJ-1-L2			
2	1: HJ-3-H1	96,82	√	×
	2: HJ-3-H2			
	3: HJ-3-L2			

Примечание: В таблице «√» указывает на то, что молекула была обнаружена, «X» указывает на то, что молекула не была обнаружена, «молекула (1 + 2 + 3)» указывает на молекулу, образованную тремя соответствующими цепями, пронумерованными 1, 2 и 3, с его левой стороны, и «неправильно спаренная молекула (1 + 2 + 3 + 3)» указывает на неправильно спаренную молекулу, образованную четырьмя соответствующими цепями 1,



2, 3 и 3, с его левой стороны.

Экспериментальные результаты показали, что VL-CL легко связывается с тяжелой цепью, в которой CH1 заменена на TCR $\beta$ , с экспрессией неправильно спаренной молекулы с двумя идентичными легкими цепями. Однако легкая цепь VL-CL не связывалась с тяжелой цепью, в которой CH1 была заменена цепью титин-Т, с образованием неправильно спаренной молекулы с двумя идентичными легкими цепями, что косвенно указывало на то, что биспецифическое антитело, в котором CH1 тяжелой цепи была заменена цепью титин-Т, по настоящему изобретению имело более превосходную способность уменьшать неправильное спаривание легкой и тяжелой цепей по сравнению с биспецифическим антителом, в котором CH1 тяжелой цепи была заменена TCR $\beta$ .

Тестовый пример 11: (FabV)<sub>2</sub>-IgG биспецифическое антитело, в котором CH1/CL заменен

I. Конструкция PDL1-TIGIT биспецифических антител, в которых заменен CH1/CL

Было сконструировано анти-PDL1-TIGIT биспецифическое антитело P-O-T в форме (FabV)<sub>2</sub>-IgG, в которой CH1/CL заменен цепью титин-Т/цепью обскурин-О (Т.10/О.24) (схематическое структурное изображение показано на фиг. 17), с использованием антитела к TIGIT, раскрытого в международной патентной заявке WO2019062832A1 (название антитела: h1708-04), и антитела к PDL1, раскрытого в международной патентной заявке WO2020177733A1 (название антитела: h1831K). P-O-T содержит 2 идентичные легкие цепи 1, 2 идентичные легкие цепи 2 и 2 идентичные тяжелые цепи, и аминокислотные последовательности полипептидных цепей P-O-T показаны следующим образом:

Легкая цепь 1 P-O-T:

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
SKLESGVPARFSGSGGTDFLTINPVEAEDTANYYCQOSFEDPLTFGOGTKLEIK  
GGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSEQQGRF  
HIENTDDLTTLLPKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO:  
146)

(Примечание: сплошная подчеркнутая часть указывает на часть вариабельной области легкой цепи VL1 (такую же, как VL h1831K), пунктирная подчеркнутая часть указывает на линкерную часть, а точечная линия указывает на часть Т.10)

Легкая цепь 2 P-O-T:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASENIYSYLAWYQOKPGKSPKLLIYNARTLA  
EGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYHSGSPLPFGGGTKVEIKRTVA  
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE  
QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ  
 ID NO: 147)

(Примечание: сплошная подчеркнутая часть указывает на часть вариабельной области легкой цепи VL2 (такую же, как VL в h1708-04), а подчеркнутая волнистой линией часть указывает на константную область легкой цепи (такую же, как CL в h1708-04))

Тяжелая цепь P-O-T:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRI  
TPSSGFAMYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARGGSSYD  
YFDYWGQGTITVTVSSGGGGSSGAPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPFPQ  
VSWEKDKQPVTAGVRFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAF  
CLGLQVDAEAGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHW  
VRQAPGQGLEWMGRIDPDSTGSKYNEKFKTRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSE  
DTAVYYCAREGAYGYYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA  
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGT  
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT  
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV  
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD  
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT  
VDKSRWQOGNVSFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 148)

(Примечание: сплошная подчеркнутая часть указывает на часть вариабельной области тяжелой цепи VH1 (такую же, как VH h1831K), двойная подчеркнутая часть указывает на часть вариабельной области тяжелой цепи VH2 (такую же, как VH h1708-04), выделенная точечной линией часть указывает на часть O.24, выделенная пунктирной линией часть указывает на линкерную часть, и выделенная волнистой линией часть указывает на часть константной области тяжелой цепи (такую же, как константная область тяжелой цепи h1708-04))

Последовательности h1831K (P-IgG1) и h1708-04 (T-IgG1) являются следующими:

Легкая цепь h1708-04:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASENIYSYLAWYQOKPGKSPKLLIYNARTLA  
EGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYHSGSPLPFGGGTKVEIKRTVA  
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE  
QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ

ID NO: 149)

Тяжелая цепь h1708-04:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGRI  
DPDSTGSKYNEKFKTRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREGAYGY  
YFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV  
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV  
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV  
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV  
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 150)

Легкая цепь h1831K:

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMHWYQOKPGQPPKLLIYAA  
SKLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEAEDTANYCYCOQSFEDPLTFGQGTKLEIK  
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE  
SVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
(SEQ ID NO: 151)

Тяжелая цепь h1831K:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRI  
TPSSGFAMYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGGSSYD  
YFDYWGQGTIVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV  
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV  
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV  
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV  
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 152)

Примечание: В приведенных выше последовательностях сплошная подчеркнутая часть указывает на переменную область, а выделенная волнистой линией часть указывает на константную область.

Кроме того, последовательности переменных областей и CDR h1708-04 и h1831K (см. Таблицу 33) являются следующими:

Переменная область легкой цепи h1708-04:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQOKPGKSPKLLIYNARTLA  
EGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCYHSGSPLPFGGGKVEIK (SEQ  
ID NO: 153)

Варибельная область тяжелой цепи h1708-04:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGRI  
DPDSTGSKYNEKFKTRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAREGAYGY  
YFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 154)

Варибельная область легкой цепи h1831K:

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMHWYQOKPGQPPKLLIYAA  
SKLESGVPARFSGSGSGTDFLTINPVEAEDTANYCQOSFEDPLTFGQGTKLEIK  
(SEQ ID NO: 155)

Варибельная область тяжелой цепи h1831K:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRI  
TPSSGFAMYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGGSSYD  
YFDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 156)

Таблица 33. Последовательности областей CDR тяжелой и легкой цепи антитела

Антитело	Тяжелая цепь		Легкая цепь	
h1708-04	HCDR1	NYWMH SEQ ID NO: 157	LCDR1	RASENIYSYLA SEQ ID NO: 160
	HCDR2	RIDPDSTGSKYNEKFKT SEQ ID NO: 158	LCDR2	NARTLAE SEQ ID NO: 161
	HCDR3	EGAYGYFDY SEQ ID NO: 159	LCDR3	QYHSGSPLP SEQ ID NO: 162
h1831K	HCDR1	SYWMH SEQ ID NO: 163	LCDR1	RASESVSIHGTHLMH SEQ ID NO: 166
	HCDR2	RITPSSGFAMYNEKFKN SEQ ID NO: 164	LCDR2	AASKLES SEQ ID NO: 167
	HCDR3	GGSSYDYFDY SEQ ID NO: 165	LCDR3	QOSFEDPLT SEQ ID NO: 168

Примечание: Последовательности областей CDR определяли согласно схеме нумерации «Кабат».

II. Анализ способности PDL1-TIGIT биспецифических антител, в которых CH1/CL заменен, связываться с PDL1 и TIGIT

Аффинность биспецифических молекул P-O-T, PDL1-his человека (hPDL1, кат. № 10084-H08H, S.B) и TIGIT-his человека (hTIGIT, кат. № 10917-H08H, S.B) по настоящему изобретению определяли с использованием Viacore T200. В частности, биосенсорный чип с белком А (кат. № 29127556, GE) использовали для аффинного захвата IgG, затем высококонцентрированный антиген 1 (hPDL1 100 нМ или hTIGIT 100 нМ) пропускали через

поверхность чипа в течение 180 с до насыщения сайтов на антителе в отношении антигена 1, с последующей инъекцией антигена 2 (hTIGIT или hPDL1), и прибор Biacore T200 использовали для обнаружения сигналов реакции в реальном времени, так что получали кривую ассоциация-диссоциация. После завершения диссоциации для каждого цикла биосенсорный чип промывали 10 mM Gly-HCl при pH 1,5 для восстановления. Данные приводили в соответствие с использованием модели 1:1. Результаты приведены в Таблице 34 ниже:

Таблица 34. Результаты анализа аффинности тестируемых антител к hPDL1 и hTIGIT

Антитело	Антиген 1	Антиген 2 (анализируемый антиген)	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	KD (M)
P-O-T		hPDL1	3,71E+06	9,53E-05	2,57E-11
P-O-T	TIGIT	hPDL1	2,68E+06	8,12E-05	3,03E-11
P-O-T		TIGIT	1,27E+06	1,23E-04	9,70E-11
P-O-T	hPDL1	TIGIT	1,26E+06	1,20E-04	9,54E-11
P-IgG1		hPDL1	2,08E+06	8,67E-05	4,17E-11
T-IgG1		TIGIT	2,14E+06	1,39E-04	6,51E-11

Результаты анализа показали, что (FabV)<sub>2</sub>-IgG биспецифическое антитело P-O-T, в котором CH1/CL заменен цепью титин-T/цепь обскурин-O, обладало хорошей способностью связывания с hPDL1 и hTIGIT, и при этом связывание P-O-T с одним антигеном не влияло на связывание P-O-T с другим антигеном.

III. Анализ блокирующего действия PDL1-TIGIT биспецифических антител, в которых CH1/CL заменен, в отношении связывания PD-L1 с PD-1 и связывания TIGIT с CD155

Описанный ниже клеточный анализ *in vitro* может быть использован для определения блокирующего действия тестируемых антител в отношении связывания PD-L1 с PD-1 и TIGIT с CD155, активность которых может быть выражена в виде значений EC<sub>50</sub>. В первый день эксперимента клетки CHOK1/PD-L1 (Promega, CS187108), стабильно экспрессирующие CD155 человека, высевали в 96-луночный планшет с полной средой F-12 Nutrient Mixture (Gibco, 11765-054), содержащей 10% FBS (Gibco, 10099-141) и антибиотики, с плотностью 4000 клеток/лунку, по 100 мкл клеточной суспензии в каждой лунке. Планшет помещали в клеточный инкубатор при 37 °C с 5% CO<sub>2</sub> для культивирования в течение ночи. На следующий день среду в планшете отбрасывали путем пипетирования,

в каждую лунку добавляли 40 мкл тестируемого антитела, разбавленного в градиенте, составленном с помощью RPMI (Gibco, 11875119), содержащей 2% FBS (Gibco, 10099-141), и 40 мкл клеток Jurkat/PD-1/NFAT-luc2 (Promega, CS187102), стабильно экспрессирующих TIGIT человека и CD226 человека, ресуспендированных в той же среде, по 50000 клеток в каждой лунке. Конечная концентрация антитела составляла 9 точек концентрации, полученных путем 3-кратного градиентного разведения из 100 нМ, и устанавливали контрольные клеточные лунки без антитела и контрольные лунки без клеток. Планшет помещали в инкубатор при 37 °C с 5% CO<sub>2</sub> для культивирования в течение 6 часов. Через 6 ч отбирали 96-луночный планшет для культивирования клеток и в каждую лунку добавляли 40 мкл субстрата для анализа люциферазы Bio-Glo™ (Promega, G7573). После того, как планшет оставляли стоять в течение 10 минут, значения сигнала люминесценции считывали на микропланшетном ридере (PerkinElmer, VICTOR 3). Относительный уровень активации рассчитывали для каждой концентрации антитела с помощью контрольных лунок. Аппроксимацию кривой проводили с использованием GraphPad Prism на основе логарифмической концентрации и относительного уровня активации антитела, и рассчитывали значения EC<sub>50</sub>.

Результаты показаны на фиг. 18. Экспериментальные результаты показали, что PDL1-TIGIT биспецифические антитела, в которых заменен CH1/CL, обладают совмещенной блокирующей активностью по сравнению с моноклональным антителом к PDL1 и моноклональным антителом к TIGIT.

#### IV. Активация антитела на туберкулин-стимулированных мононуклеарных клетках периферической крови

Анализ клеток *in vitro*, описанный ниже, использовали для определения активации тестируемых антител в отношении секреции IFN- $\gamma$  туберкулин-стимулированными мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК), активность которых может быть выражена в виде значений EC<sub>50</sub>. В первый день эксперимента МКПК отделяли от свежей крови здорового человека с использованием разделительной пробирки SepMate™-50 (STEMCELL, 86450) в соответствии с инструкцией по применению. Клетки высевали в 6-луночный планшет со средой RPMI (Gibco, 11875119), содержащей 10% FBS (Gibco, 10099-141) и туберкулин, подвергнутый 800-кратному разведению (Synbiotics, 97-8800), при плотности  $4 \times 10^6$  клеток/лунку с 2 мл клеточной суспензии в каждой лунке. Планшет помещали в инкубатор при 37 °C с 5% CO<sub>2</sub> клеткой для культивирования в течение 5 дней. На четвертый день белок CD155/PVR человека (Acro, CD5-H5223) разбавляли до 2,5 мкг/мл с помощью PBS и добавляли в 96-луночный планшет для культивирования клеток при

100 мкл/лунку, и планшет помещали в холодильник при 4 °С для нанесения покрытия в течение ночи. На пятый день 96-луночный планшет для культивирования клеток, покрытый белком, дважды промывали PBS, а туберкулин-стимулированные МКПК собирали и высевали в 96-луночный планшет со средой RPMI, содержащей 10% FBS, при плотности  $1 \times 10^5$  клеток/лунку, с 90 мкл клеточной суспензии в каждой лунке. Затем в каждую лунку добавляли 10 мкл тестируемого антитела, разбавленного PBS. Конечная концентрация антитела составляла 9 точек концентрации, полученных 3-кратным серийным разведением из 200 нМ. Задавали контрольные клеточные лунки без антител. Планшет помещали в клеточный инкубатор при 37 °С с 5% CO<sub>2</sub> для культивирования в течение 3 дней. На восьмой день 96-луночный планшет для культивирования клеток центрифугировали при 250 g в течение 5 минут, супернатант переносили в новый 96-луночный планшет и подвергали 20-кратному разведению с использованием набора Human IFN- $\gamma$  ELISA (NeoBioscience, ENC102g.96.10). Определяли содержание IFN- $\gamma$  в супернатанте. Относительный уровень активации рассчитывали для группы обработки антителом с помощью контрольных лунок. Аппроксимацию кривой проводили с использованием Graphpad Prism 5 на основе концентрации и соответствующего относительного уровня активации антитела, и рассчитывали значения EC<sub>50</sub>.

Экспериментальные результаты показаны на фиг. 19. Экспериментальные результаты показали, что PDL1-TIGIT биспецифические антитела, в которых заменен CH1/CL, могут лучше блокировать иммуносупрессию и способствовать секреции IFN- $\gamma$  по сравнению с моноклональными антителами.

V. Анализ *in vivo* эффективности PDL1-TIGIT биспецифических антител, в которых заменен CH1/CL

В этом эксперименте двойным трансгенным мышам в отношении человеческого PD-1-TIGIT инокулировали клетки MC38-HL1, стабильно трансфицированные с PD-L1 человека, и группировали при образовании опухоли, чтобы сравнить эффективность комбинации PD-L1 и TIGIT с эффективностью PDL1-TIGIT биспецифического антитела.

82 самки PD-1-TIGIT двойных трансгенных мышей в возрасте 6-8 недель и весом около 16-18 г приобретали у Biocytogen и содержали по 5 мышей/клетке в среде с SPF-классом (свободный от патогенной флоры) при температуре 20-25 °С и влажности 40-60 % с номером лицензии SCXK (Beijing) 2015-0008. Мышей акклиматизировали в течение около 10 дней. Подкожно инокулировали 100 мкл клеток MC38-HL1 ( $2,0 \times 10^5$  клеток) в правый бок 82 hPD-1/TIGIT двойных трансгенных мышей. После образования опухоли (около 110 мм<sup>3</sup>) мышей со слишком большой или слишком маленькой опухолью удаляли, а остальных

мышей случайным образом разделяли на 5 групп в соответствии с объемом опухоли, то есть группу отрицательного контроля C25-IgG1 (нерелевантный целевой белок IgG1), группу P-IgG1 + T-IgG1, группу P-O-T, группу P-IgG1 и группу T-IgG1, по 8 мышей в каждой группе. Конкретная информация приведена в таблице 35. В день эксперимента антитело вводили путем внутривентриальной инъекции один раз в неделю в общей сложности 3 недели. Объемы опухоли и массу тела измеряли два раза в неделю, и данные записывали.

Таблица 35. Группировка для эксперимента по ингибированию ксенотрансплантатных опухолей у мышей MC38-HL1

Группа	Доза введения (мг/кг)	Способ введения		Период введения
C25-IgG1	9 мг/кг	i.p	qw	21 день
P-IgG1+T-IgG1	P-IgG1 9 мг/кг + T-IgG1 9 мг/кг	i.p	qw	21 день
P-O-T	5 мг/кг	i.p	qw	21 день
P-IgG1	9 мг/кг	i.p	qw	21 день
T-IgG1	9 мг/кг	i.p	qw	21 день

Примечание: В таблице i.p указывает на внутривентриальную инъекцию, а qw указывает на один раз в неделю.

Данные записывали с использованием статистического программного обеспечения Excel: средние значения подсчитывали как avg; значения SD (среднеквадратическое отклонение) рассчитывали как STDEV (квадратный корень дисперсии выборки); значения SEM (стандартная ошибка среднего значения) рассчитывали как STDEV/SQRT (количество животных в группе); для построения графика использовали программное обеспечение GraphPad Prism, а статистический анализ данных проводили с использованием двустороннего дисперсионного анализа, одностороннего дисперсионного анализа или t-критерия.

Объем опухоли (V) рассчитывали как:  $V = 1/2 \times L_{\text{длинная}} \times L_{\text{короткая}}^2$

Относительная степень пролиферации опухоли T/C (%) =  $(T - T_0) / (C - C_0) \times 100\%$ , где T и C представляют собой объемы опухоли животных в конце эксперимента в группе лечения и контрольной группе, соответственно;  $T_0$  и  $C_0$  представляют собой объемы опухоли животных в начале эксперимента в группе лечения и контрольной группе, соответственно.

Результаты представлены в таблице 36 и фиг. 20.

Таблица 36. Ингибирование роста опухоли (%) антителами в отношении ксенотрансплантатных опухолей у мышей MC38-HL1



Группа	Ингибирование роста опухоли (TGI %)
C25-IgG1	/
P-IgG1+T-IgG1	43 %
P-O-T	55 %
P-IgG1	3 %
T-IgG1	минус 39 %

Экспериментальный результат показал, что на день 22, по сравнению с группой отрицательного контроля C25-IgG1, группа комбинации P-IgG1 при 9 мг/кг и T-IgG1 при 9 мг/кг имела ингибирование роста опухоли 43 %, и группа P-O-T при 5 мг/кг имела степень ингибирования опухоли 55 %. Следовательно, они могут значительно ингибировать рост опухолей MC38-HL1, при этом эффект ингибирования опухоли значительно превосходит эффект групп только P-IgG1 и только T-IgG1.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Димеризованный полипептид, содержащий цепь титин-Т и цепь обскурин-О или цепь титин-Т и цепь обскурин-подобный-О, где

i) цепь титин-Т представляет собой вариант SEQ ID NO: 32, где вариант содержит замены аминокислотных остатков в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 60 и 64, по сравнению с SEQ ID NO: 32, и/или

ii) цепь обскурин-О представляет собой вариант SEQ ID NO: 33, где вариант содержит замены аминокислотных остатков в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 13, 32, 48, 66, 82 и 93, по сравнению с SEQ ID NO: 33;

при условии, что:

a) когда вариант не содержит замены аминокислотного остатка в положении 13, 48, 66, 82 или 93 и содержит замену аминокислотного остатка в положении 32, аминокислотная замена в положении 32 не представляет собой 32P;

b) когда вариант не содержит замены аминокислотного остатка в положении 32, 48, 66, 82 или 93 и содержит замену аминокислотного остатка в положении 13, аминокислотная замена в положении 13 не представляет собой 13Y; и

c) когда вариант не содержит замены аминокислотного остатка в положении 48, 66, 82 или 93 и содержит замены аминокислотных остатков в положениях 13 и 32, замена аминокислотного остатка в положении 13 не представляет собой 13Y, и замена аминокислотного остатка в положении 32 не представляет собой 32P.

2. Димеризованный полипептид по п. 1, где вариант SEQ ID NO: 32 содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 60S и 64T, и/или вариант SEQ ID NO: 33 содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 13S, 32F, 48V, 66C, 82H и 93C;

предпочтительно вариант SEQ ID NO: 32 содержит замены аминокислотных остатков 60S и 64T, и/или вариант SEQ ID NO: 33 содержит замены аминокислотных остатков, выбранные из любого из а)-с):

a) 32F и 48V;

b) 13S, 32F, 48V и 82H; и

c) 13S, 32F, 48V, 66C, 82H и 93C.

3. Димеризованный полипептид по п. 1 или п. 2, где вариант SEQ ID NO: 32 дополнительно содержит замены аминокислотных остатков в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 3, 8, 11, 13, 20, 22, 25, 26, 39, 40, 42, 45, 47, 49, 56, 58, 66, 70, 75, 77, 79, 81, 82, 83 и 84, по сравнению с SEQ ID NO: 32;

предпочтительно, вариант SEQ ID NO: 32 дополнительно содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 3W, 8C, 11I, 13L, 20C, 22M/22C, 25S, 26C, 39T, 40S, 42K, 45S, 47E, 49G, 56S, 58E, 66S/66K, 70R, 75V, 77S, 79T, 81R, 82M, 83D и 84L, по сравнению с SEQ ID NO: 32;

более предпочтительно, вариант SEQ ID NO: 32 дополнительно содержит замены аминокислотных остатков, выбранные из любого из а)-l), по сравнению с SEQ ID NO: 32:

- a) 8C, 25S и 39T;
- b) 20C, 25S и 39T;
- c) 25S, 26C и 39T;
- d) 22C, 25S и 39T;
- e) 8C, 25S, 39T, 66S и 77S;
- f) 8C, 25S, 39T, 66K, 70R, 79T и 81R;
- g) 3W, 8C, 11I, 13L, 22M, 25S, 39T и 82M;
- h) 8C, 11I, 25S, 39T, 66K, 79T и 81R;
- i) 8C, 25S, 39T, 40S, 42K, 45S, 47E, 49G, 56S, 58E, 75V, 83D и 84L;
- j) 8C, 25S, 39T, 47E, 49G, 56S, 58E и 75V;
- k) 8C, 25S, 39T, 56S, 58E и 75V; и
- l) 8C, 25S, 39T, 56S, 58E, 66S и 77S;

наиболее предпочтительно, вариант SEQ ID NO: 32 содержит замены аминокислотных остатков, выбранные из любого из A)-C), по сравнению с SEQ ID NO: 32:

- A) 8C, 11I, 25S, 39T, 60S, 64T, 66K, 79T и 81R;
- B) 8C, 11I, 20C, 25S, 39T, 60S, 64T, 66K, 79T и 81R; и
- C) 8C, 11I, 25S, 26C, 39T, 60S, 64T, 66K, 79T и 81R.

4. Димеризованный полипептид по любому из пп. 1-3, где вариант SEQ ID NO: 33 дополнительно содержит замены аминокислотных остатков в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 2, 3, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 17, 20, 22, 25, 30, 32, 34, 36, 41, 42, 44, 45, 53, 58, 62, 67, 69, 76, 88, 89, 92, 94 и 97, по сравнению с SEQ ID NO: 33;

предпочтительно,

вариант SEQ ID NO: 33 дополнительно содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 2E, 3C, 7K/7R, 9C, 11L, 12S, 13Y, 14T, 17E, 20L, 22M/22S, 25S, 30D, 32P, 34E, 36T, 41K, 42L, 44I, 45T, 53L, 58V, 62E/62K/62H, 67Q/67T, 69S, 76S, 88C, 89L, 92E, 94G и 97G, по сравнению с SEQ ID NO: 33;

более предпочтительно, вариант SEQ ID NO: 33 дополнительно содержит замены аминокислотных остатков, выбранные из любого из A)-R), по сравнению с SEQ ID NO: 33:

- A) 88C;
- B) 3C;
- C) 9C;
- D) 25S, 76S и 88C;
- E) 25S, 76S и 3C;
- F) 25S, 76S и 9C;
- G) 7K, 25S, 62K, 76S и 88C;
- H) 7K, 25S, 62H, 76S и 88C;
- I) 7R, 25S, 62K, 76S и 88C;
- G) 7R, 25S, 62H, 76S и 88C;
- K) 11L, 25S, 62K, 76S и 88C;
- L) 11L, 25S, 62H, 76S и 88C;
- M) 12S, 13Y, 14T, 22S, 25S, 62K, 76S и 88C;
- N) 2E, 11L, 17E, 25S, 30D, 32P, 34E, 36T, 44I, 45T, 58V, 62E, 67Q, 69S, 76S, 88C и 97G;
- O) 11L, 20L, 22M, 25S, 53L, 62K, 76S и 88C;
- P) 11L, 25S, 41K, 45T, 62K, 67Q, 69S, 76S, 88C и 89L;
- Q) 11L, 25S, 42L, 45T, 62K, 67T, 69S, 76S, 88C, 92E и 94G; и
- R) 11L, 12S, 13Y, 22S, 25S, 42L, 45T, 62K, 67Q, 69S, 76S, 88C, 92E и 94G;

наиболее предпочтительно, вариант SEQ ID NO: 33 содержит замены аминокислотных остатков, выбранные из любого из а)-j), по сравнению с SEQ ID NO: 33:

- a) 25S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 67Q, 69S, 76S, 88C и 89L;
- b) 13S, 25S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 67Q, 69S, 76S, 82H, 88C и 89L;
- c) 3C, 13S, 25S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 67Q, 69S, 76S, 82H, 88C и 89L;
- d) 9C, 13S, 25S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 67Q, 69S, 76S, 82H, 88C и 89L;
- e) 13S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 67Q, 69S, 82H, 88C и 89L;
- f) 3C, 13S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 67Q, 69S, 82H, 88C и 89L;
- g) 9C, 13S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 67Q, 69S, 82H, 88C и 89L;
- h) 13S, 25S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 66C, 67Q, 69S, 76S, 82H, 88C, 89L и 93C;
- i) 3C, 13S, 25S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 66C, 67Q, 69S, 76S, 82H, 88C, 89L и 93C; и
- j) 9C, 13S, 25S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 66C, 67Q, 69S, 76S, 82H, 88C, 89L и 93C.

5. Димеризованный полипептид по любому из пп. 1-3, где цепь обскурин-подобный-О представляет собой SEQ ID NO: 34 или ее вариант, где вариант SEQ ID NO: 34 содержит замены аминокислотных остатков в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из положений 6, 26, 74, 77, 84 и 86;

предпочтительно вариант SEQ ID NO: 34 содержит одну или более замен

аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 6E, 26S, 74C, 77S, 84C и 86C;

более предпочтительно, вариант SEQ ID NO: 34 содержит замены аминокислотных остатков, выбранные из любого из A)-F):

- A) 6E и 74C;
- B) 6E и 84C;
- C) 6E и 86C;
- D) 6E, 26S, 77S и 74C;
- E) 6E, 26S, 77S и 84C; и
- F) 6E, 26S, 77S и 86C.

6. Димеризованный полипептид по любому из пп. 1-4, где

цепь титин-Т представляет собой вариант SEQ ID NO: 32, 68 или 127, где вариант содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 60S и 64T; и цепь обскурин-О представляет собой вариант SEQ ID NO: 33, 80 или 128, где вариант содержит одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 13S, 32F, 48V, 66C, 82H и 93C;

предпочтительно, цепь титин-Т имеет по меньшей мере 85% идентичность последовательности с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 129-131, и цепь обскурин-О имеет по меньшей мере 85% идентичность последовательности с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 132-141;

более предпочтительно, цепь титин-Т имеет аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 129-131, и цепь обскурин-О имеет аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 132-141.

7. Антигенсвязывающая молекула, содержащая димеризованный полипептид по любому из пп. 1-6.

8. Антигенсвязывающая молекула по п. 7, содержащая первый антигенсвязывающий фрагмент, содержащий Fab с модифицированным доменом, содержащий переменную область тяжелой цепи VH1, переменную область легкой цепи VL1 и димеризованный полипептид, но не содержащий константную область легкой цепи CL или константную область тяжелой цепи CH1, где каждая из VH1 и VL1 связана с любой из пептидных цепей димеризованного полипептида посредством линкера;

предпочтительно, С-конец VH1 слит с N-концом цепи титин-Т димеризованного полипептида по любому из пп. 1-6 посредством линкера, и С-конец VL1 слит с N-концом цепи обскурин-О или цепи обскурин-подобный-О димеризованного полипептида по

любому из пп. 1-6 посредством линкера; или

С-конец VL1 слит с N-концом цепи титин-Т димеризованного полипептида по любому из пп. 1-6 посредством линкера, и С-конец VH1 слит с N-концом цепи обскурин-О или цепи обскурин-подобный-О димеризованного полипептида по любому из пп. 1-6 посредством линкера.

9. Антигенсвязывающая молекула по п. 7 или п. 8, содержащая первый антигенсвязывающий фрагмент, содержащий:

а. пептидную цепь [VH1]-[линкер 1]-[цепь титин-Т] в порядке от N-конца к С-концу и пептидную цепь [VL1]-[линкер 2]-[цепь обскурин-О или цепь обскурин-подобный-О] в порядке от N-конца к С-концу; или

б. пептидную цепь [VH1]-[линкер 1]-[цепь обскурин-О или цепь обскурин-подобный-О] в порядке от N-конца к С-концу и пептидную цепь [VL1]-[линкер 2]-[цепь титин-Т] в порядке от N-конца к С-концу;

где линкер 1 и линкер 2 являются идентичными или различными;

цепь титин-Т и цепь обскурин-О или цепь обскурин-подобный-О являются такими, как определено в любом из пп. 1-6;

предпочтительно,

А) линкер 1 и линкер 2 оба представляют собой линкеры  $(G_xS)_y$ , где x выбран из группы, состоящей из целых чисел от 1 до 5, и y выбран из группы, состоящей из целых чисел от 0 до 6, или

В) линкер 1 представляет собой С-концевую усеченную последовательность CH1, и линкер 2 представляет собой С-концевую усеченную последовательность CL;

более предпочтительно,

А) линкер 1 представлен в SEQ ID NO: 173; линкер 2 представлен в SEQ ID NO: 174;

или

В) линкер 1 и линкер 2 оба представлены в SEQ ID NO: 175; или

С) линкер 1 и линкер 2 оба представлены в SEQ ID NO: 176.

10. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 7-9, дополнительно содержащая область Fc, содержащую первую субъединицу Fc1 и вторую субъединицу Fc2, способные связываться друг с другом;

предпочтительно, область Fc содержит одну или более аминокислотных замен, которые снижают гомодимеризацию; и/или область Fc содержит одну или более аминокислотных замен, способных снижать связывание области Fc с Fc-рецептором;

более предпочтительно, Fc1 имеет структуру выступа в соответствии с методом «выступ-во-впадину», и Fc2 имеет структуру впадины в соответствии с методом «выступ-

во-впадину»; или Fc2 имеет структуру выступа в соответствии с методом «выступ-во-впадину», и Fc1 имеет структуру впадины в соответствии с методом «выступ-во-впадину»;

наиболее предпочтительно, Fc1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 177, и Fc2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 178; или Fc1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 178, и Fc2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 177.

11. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 7-10, содержащая первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент, который содержит вариабельную область тяжелой цепи VH2 и вариабельную область легкой цепи VL2, и первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент связываются с различными антигенами или различными эпитопами на одном и том же антигене;

предпочтительно, второй антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab.

12. Антигенсвязывающая молекула по п. 11, содержащая первую тяжелую цепь, первую легкую цепь, вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь; где

a. первая тяжелая цепь содержит [VH1]-[линкер 1]-[цепь титин-Т]-[линкер 3]-[Fc1] в порядке от N-конца к C-концу,

первая легкая цепь содержит [VL1]-[линкер 2]-[цепь обскурин-О или цепь обскурин-подобный-О] в порядке от N-конца к C-концу,

вторая тяжелая цепь содержит [VH2]-[CH1]-[Fc2] в порядке от N-конца к C-концу, и вторая легкая цепь содержит [VL2]-[CL] в порядке от N-конца к C-концу; или

b. первая тяжелая цепь содержит [VH1]-[линкер 1]-[цепь обскурин-О или цепь обскурин-подобный-О]-[линкер 3]-[Fc1] в порядке от N-конца к C-концу,

первая легкая цепь содержит [VL1]-[линкер 2]-[цепь титин-Т] в порядке от N-конца к C-концу,

вторая тяжелая цепь содержит [VH2]-[CH1]-[Fc2] в порядке от N-конца к C-концу, и вторая легкая цепь содержит [VL2]-[CL] в порядке от N-конца к C-концу;

где линкер 1, линкер 2 и линкер 3 являются идентичными или различными;

предпочтительно, каждая из Fc1 и Fc2 независимо содержит одну или более аминокислотных замен, которые снижают гомодимеризацию;

более предпочтительно,

A) линкер 1, линкер 2 и линкер 3 все представляют собой  $(G_xS)_y$ , где x выбран из группы, состоящей из целых чисел от 1 до 5, и y выбран из группы, состоящей из целых чисел от 0 до 6, или

B) линкер 1 представляет собой C-концевую усеченную последовательность CH1,

линкер 2 представляет собой С-концевую усеченную последовательность CL, и линкер 3 представляет собой  $(G_xS)_y$ , где x выбран из группы, состоящей из целых чисел от 1 до 5, и y выбран из группы, состоящей из целых чисел от 0 до 6;

наиболее предпочтительно,

А) линкер 1 представлен в SEQ ID NO: 173; линкер 2 представлен в SEQ ID NO: 174; линкер 3 представляет собой связь; или

В) линкер 1 и линкер 2 оба представлены в SEQ ID NO: 175; линкер 3 представляет собой связь; или

С) линкер 1 и линкер 2 оба представлены в SEQ ID NO: 176; линкер 3 представляет собой связь.

13. Антигенсвязывающая молекула по п. 12, где:

(I) антигенсвязывающая молекула способна связываться с NGF и RANKL;

предпочтительно,

антигенсвязывающая молекула содержит первую тяжелую цепь, первую легкую цепь, вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, где:

первая тяжелая цепь содержит [VH1]-[линкер 1]-[цепь обскурин-О]-[линкер 3]-[Fc1] в порядке от N-конца к С-концу,

первая легкая цепь содержит [VL1]-[линкер 2]-[цепь титин-Т] в порядке от N-конца к С-концу,

вторая тяжелая цепь содержит [VH2]-[CH1]-[Fc2] в порядке от N-конца к С-концу, и вторая легкая цепь содержит [VL2]-[CL] в порядке от N-конца к С-концу;

где: VH1 образует с VL1 первый антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с NGF, и VH2 образует с VL2 второй антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с RANKL; или

VH1 образует с VL1 первый антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с RANKL, и VH2 образует с VL2 второй антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с NGF;

более предпочтительно,

VH1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, VL1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, VH2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, и VL2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25; или

VH1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, VL1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25, VH2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, и VL2 имеет последовательность, представленную в SEQ



ID NO: 27;

и цепь обскурин-О имеет последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 132-141, и цепь титин-Т имеет последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 129-131;

наиболее предпочтительно,

Fc1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 177; Fc2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 178; CH1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 179; CL имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4; линкер 3 представляет собой связь; линкер 1 и линкер 2 выбраны из группы, состоящей из: а) линкера 1 и линкера 2, оба из которых представлены в SEQ ID NO: 175; и б) линкера 1, представленного в SEQ ID NO: 173, и линкера 2, представленного в SEQ ID NO: 174;

(II) антигенсвязывающая молекула способна связываться с PDL1 и CTLA4;

предпочтительно,

антигенсвязывающая молекула содержит первую тяжелую цепь, первую легкую цепь, вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, где:

первая тяжелая цепь содержит [VH1]-[линкер 1]-[цепь обскурин-О]-[линкер 3]-[Fc1] в порядке от N-конца к C-концу,

первая легкая цепь содержит [VL1]-[линкер 2]-[цепь титин-Т] в порядке от N-конца к C-концу,

вторая тяжелая цепь содержит [VH2]-[CH1]-[Fc2] в порядке от N-конца к C-концу, и вторая легкая цепь содержит [VL2]-[CL] в порядке от N-конца к C-концу; где:

VH1 образует с VL1 первый антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с PDL1, и VH2 образует с VL2 второй антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с CTLA4; или

VH1 образует с VL1 первый антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с CTLA4, и VH2 образует с VL2 второй антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с PDL1;

более предпочтительно,

VH1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 156, VL1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 155, VH2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 169, и VL2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 170; или

VH1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 169, VL1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 170, VH2 имеет последовательность,

представленную в SEQ ID NO: 156, и VL2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 155;

и цепь обскурин-О имеет последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 132-141, и цепь титин-Т имеет последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 129-131;

наиболее предпочтительно,

Fc1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 178; Fc2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 177; CH1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 179; CL имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4; линкер 3 представляет собой связь; линкер 1 и линкер 2 выбраны из группы, состоящей из: а) линкера 1 и линкера 2, оба из которых представлены в SEQ ID NO: 175; и б) линкера 1, представленного в SEQ ID NO: 173, и линкера 2, представленного в SEQ ID NO: 174; или

(III) антигенсвязывающая молекула способна связываться с IL5 и TSLP;

предпочтительно,

антигенсвязывающая молекула содержит первую тяжелую цепь, первую легкую цепь, вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, где:

первая тяжелая цепь содержит [VH1]-[линкер 1]-[цепь титин-Т]-[линкер 3]-[Fc1] в порядке от N-конца к C-концу;

первая легкая цепь содержит [VL1]-[линкер 2]-[цепь обскурин-О] в порядке от N-конца к C-концу;

вторая тяжелая цепь содержит [VH2]-[CH1]-[Fc2] в порядке от N-конца к C-концу, и вторая легкая цепь содержит [VL2]-[CL] в порядке от N-конца к C-концу; где:

VH1 образует с VL1 первый антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с IL5, и VH2 образует с VL2 второй антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с TSLP; или

VH1 образует с VL1 первый антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с TSLP, и VH2 образует с VL2 второй антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с IL5;

более предпочтительно,

VH1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, VL1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, VH2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 171, и VL2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 172; или

VH1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 171, VL1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 172, VH2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, и VL2 имеет последовательность, представленную в SEQ

ID NO: 17;

и цепь обскурин-О имеет последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 132-141, и цепь титин-Т имеет последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 129-131;

наиболее предпочтительно,

Fc1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 178; Fc2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 177; CH1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 179; CL имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4; линкер 3 представляет собой связь; линкер 1 и линкер 2 выбраны из группы, состоящей из: а) линкера 1 и линкера 2, оба из которых имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 175; и б) линкера 1, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 173, и линкера 2, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 174.

14. Антигенсвязывающая молекула по п. 11, содержащая:

а. первую тяжелую цепь, содержащую [VH1]-[линкер 1]-[цепь титин-Т]-[линкер 3]-[VH2]-[CH1]-[Fc1] в порядке от N-конца к С-концу;

вторую тяжелую цепь, содержащую [VH1]-[линкер 1]-[цепь титин-Т]-[линкер 3]-[VH2]-[CH1]-[Fc2] в порядке от N-конца к С-концу;

первую легкую цепь, содержащую [VL1]-[линкер 2]-[цепь обскурин-О или цепь обскурин-подобный-О] в порядке от N-конца к С-концу, и

вторую легкую цепь, содержащую [VL2]-[CL] в порядке от N-конца к С-концу; или

б. первую тяжелую цепь, содержащую [VH1]-[линкер 1]-[цепь обскурин-О или цепь обскурин-подобный-О]-[линкер 3]-[VH2]-[CH1]-[Fc1] в порядке от N-конца к С-концу,

вторую тяжелую цепь, содержащую [VH1]-[линкер 1]-[цепь обскурин-О или цепь обскурин-подобный-О]-[линкер 3]-[VH2]-[CH1]-[Fc2] в порядке от N-конца к С-концу;

первую легкую цепь, содержащую [VL1]-[линкер 2]-[цепь титин-Т] в порядке от N-конца к С-концу, и

вторую легкую цепь, содержащую [VL2]-[CL] в порядке от N-конца к С-концу;

где линкер 1, линкер 2 и линкер 3 являются идентичными или различными;

предпочтительно, Fc1 и Fc2 являются идентичными, или каждая из Fc1 и Fc2 независимо содержит одну или более аминокислотных замен, которые снижают гомодимеризацию;

более предпочтительно,

А) линкер 1, линкер 2 и линкер 3 все представляют собой линкеры  $(G_xS)_y$ , где x выбран из группы, состоящей из целых чисел от 1 до 5, и y выбран из группы, состоящей из

целых чисел от 0 до 6; предпочтительно, все они представлены в SEQ ID NO: 175 или SEQ ID NO: 176, или

В) линкер 1 представляет собой С-концевую усеченную последовательность CH1, и предпочтительно линкер 1 представлен в SEQ ID NO: 173; линкер 2 представляет собой С-концевую усеченную последовательность CL, и предпочтительно линкер 2 представлен в SEQ ID NO: 174; линкер 3 представляет собой линкер  $(G_xS)_y$ , где x выбран из группы, состоящей из целых чисел от 1 до 5, и y выбран из группы, состоящей из целых чисел от 0 до 6, и предпочтительно линкер 3 представлен в SEQ ID NO: 175 или SEQ ID NO: 176;

наиболее предпочтительно,

антигенсвязывающая молекула способна связываться с PDL1 и TIGIT.

15. Антигенсвязывающая молекула, содержащая первый антигенсвязывающий фрагмент, способный специфически связываться с PDL1, и второй антигенсвязывающий фрагмент, способный специфически связываться с TIGIT, где первый антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи VH1 и переменную область легкой цепи VL1, и второй антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи VH2 и переменную область легкой цепи VL2; где

VH1 содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164 и SEQ ID NO: 165, соответственно, и VL1 содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167 и SEQ ID NO: 168, соответственно; и/или

VH2 содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158 и SEQ ID NO: 159, соответственно, и VL2 содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161 и SEQ ID NO: 162, соответственно;

предпочтительно,

VH1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 156, или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 156, и VL1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 155, или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 155; и/или

VH2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 154, или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 154, и VL2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 153, или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 153;

более предпочтительно, антигенсвязывающая молекула имеет:

тяжелую цепь, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 148, или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 148;

первую легкую цепь, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 146, или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 146; и

вторую легкую цепь, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 147, или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 147.

16. Антитело с модифицированным доменом, представляющее собой антитело, в котором константная область тяжелой цепи CH1 и константная область легкой цепи CL заменены димеризованным полипептидом по любому из пп. 1-6, где

предпочтительно константная область тяжелой цепи CH1 заменена цепью титин-Т, и константная область легкой цепи CL заменена цепью обскурин-О; или константная область легкой цепи CL заменена цепью титин-Т, и константная область тяжелой цепи CH1 заменена цепью обскурин-О.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающую молекулу по любому из пп. 7-15 или антитело с модифицированным доменом по п. 16 и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или эксципиентов.

18. Применение димеризованного полипептида по любому из пп. 1-6 для уменьшения неправильного спаривания легкой/тяжелой цепи при получении мультиспецифического антитела,

предпочтительно для уменьшения неправильного спаривания легкой цепи/тяжелой цепи при получении биспецифического антитела.

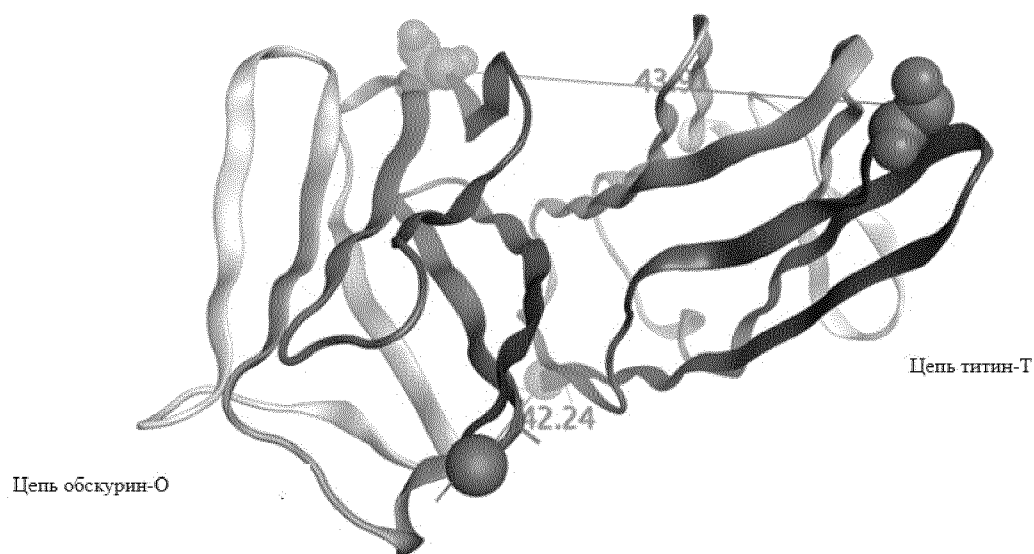
19. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая димеризованный полипептид по любому из пп. 1-6, антигенсвязывающую молекулу по любому из пп. 7-15 или антитело с модифицированным доменом по п. 16.

20. Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 19.

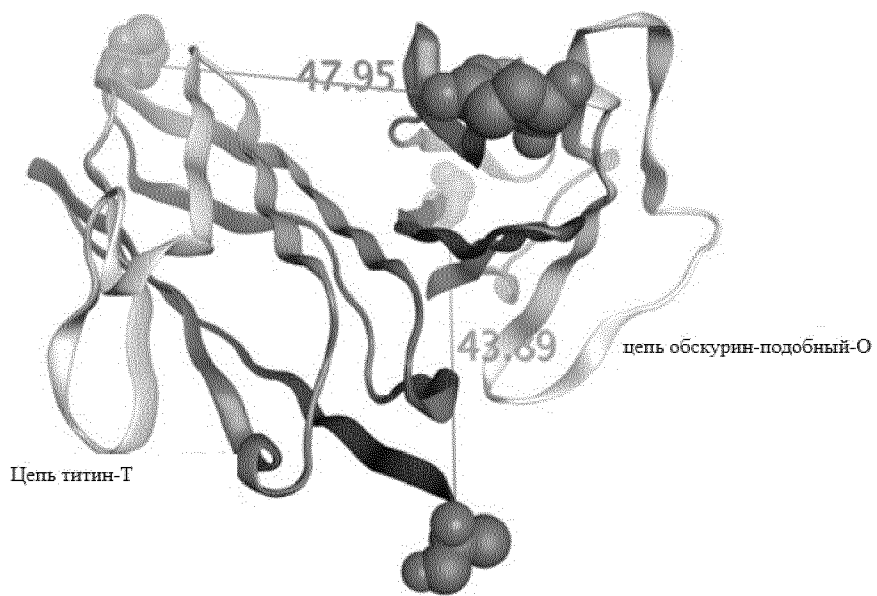
21. Способ получения димеризованного полипептида по любому из пп. 1-6, антигенсвязывающей молекулы по любому из пп. 7-15 или антитела с модифицированным доменом по п. 16, включающий стадии: культивирования клетки-хозяина по п. 20 и очистки и выделения димеризованного полипептида, антигенсвязывающей молекулы или антитела с модифицированным доменом.

22. Применение антигенсвязывающей молекулы по любому из пп. 7-15, антитела с модифицированным доменом по п. 16 или фармацевтической композиции по п. 17 для

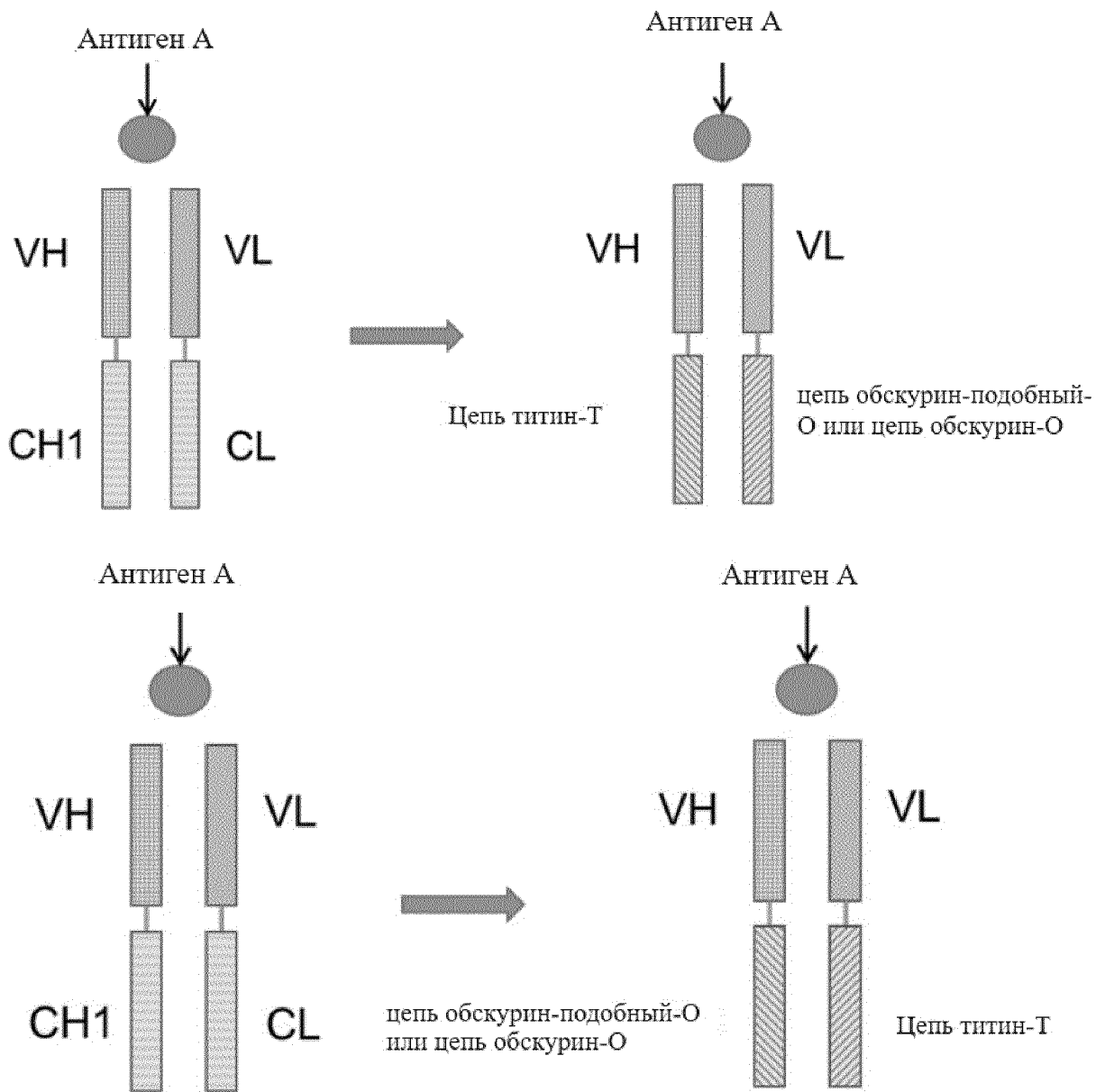
получения лекарственного средства для лечения или предотвращения заболевания или состояния.



ФИГУРА 1А

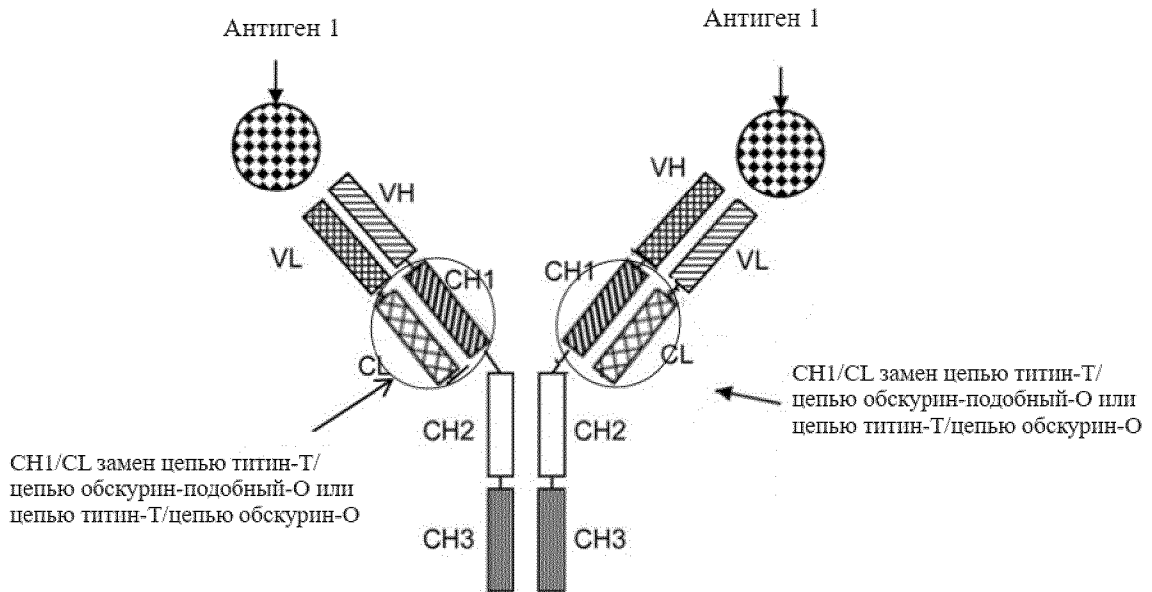


ФИГУРА 1В

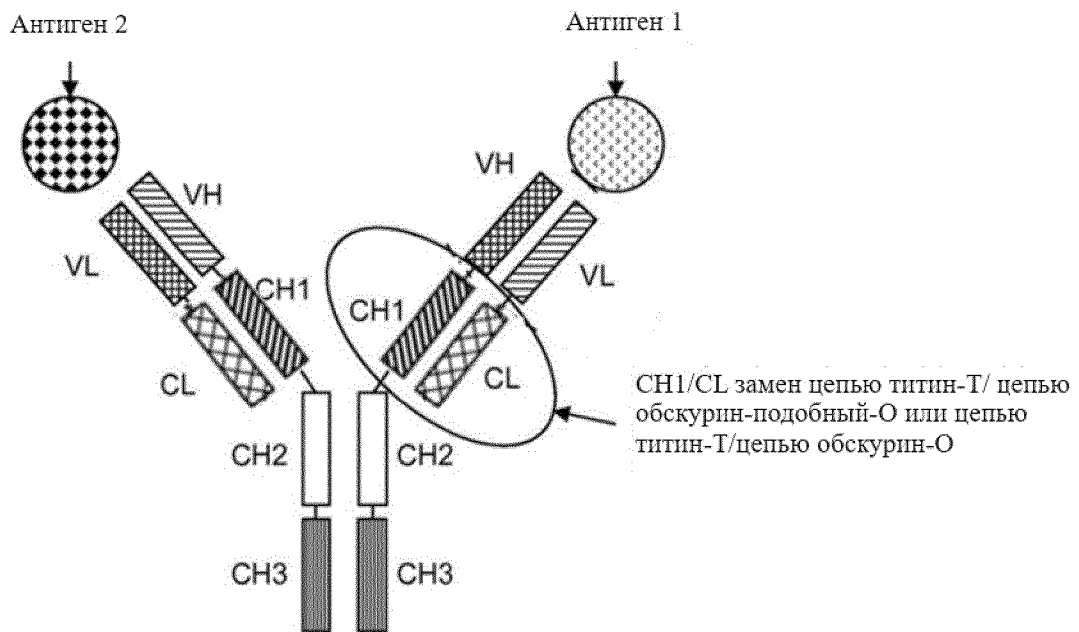


ФИГУРА 2

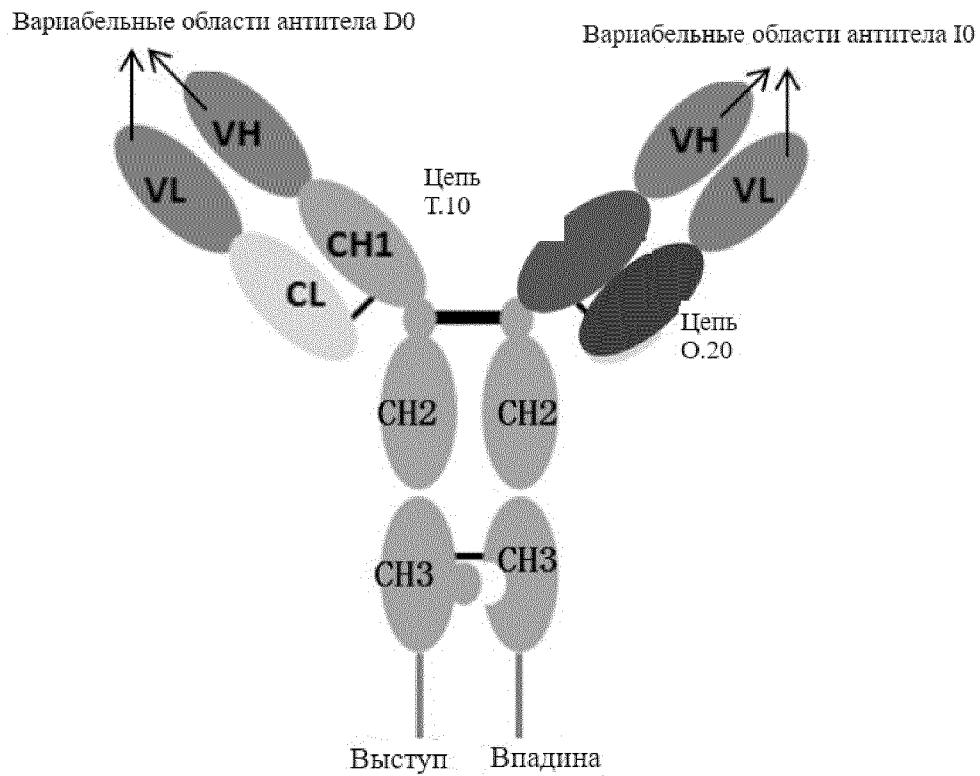




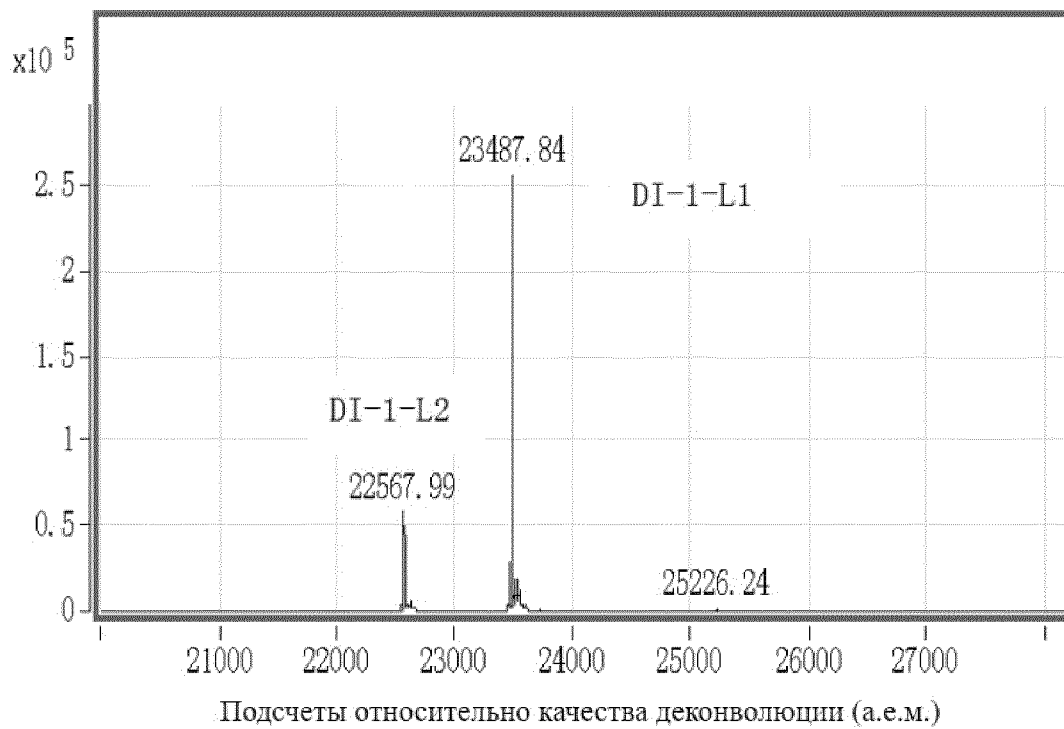
ФИГУРА 3



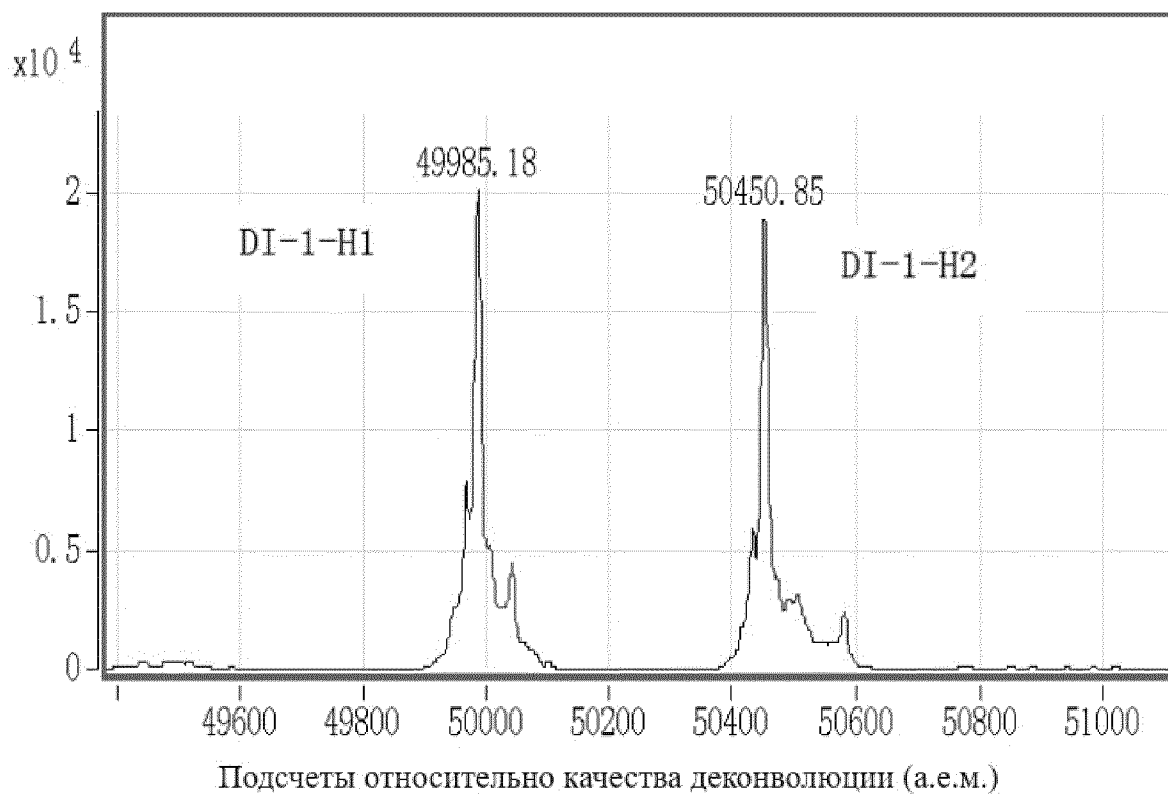
ФИГУРА 4



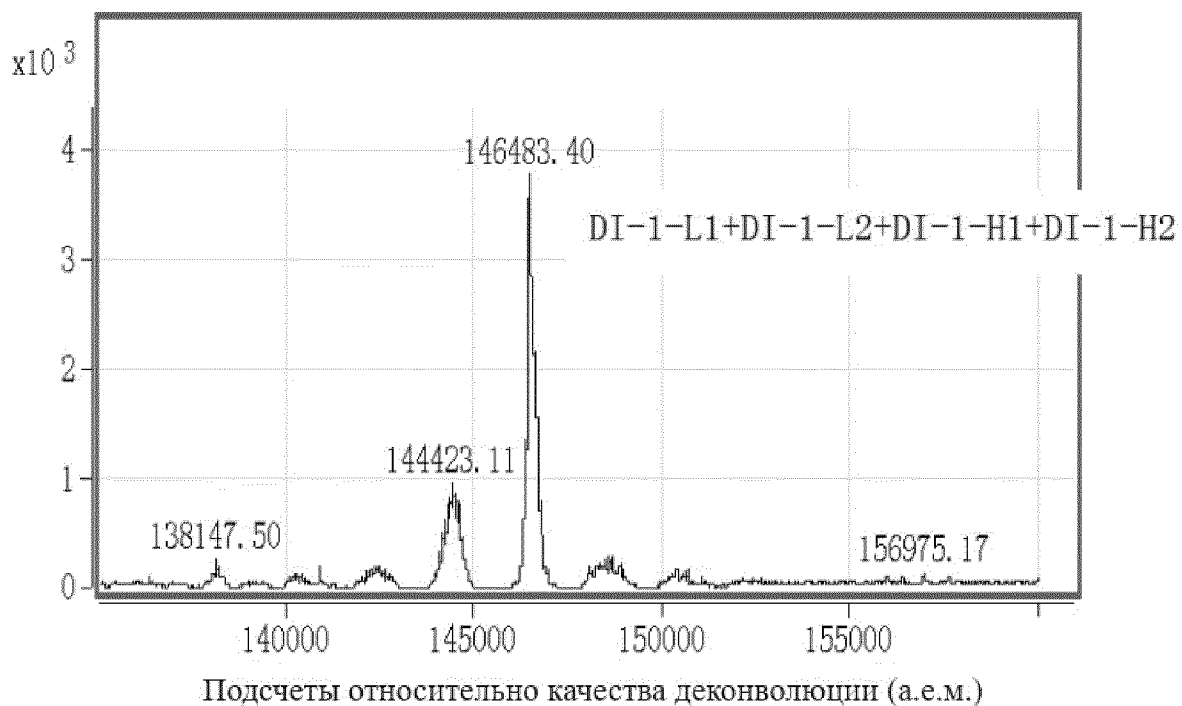
ФИГУРА 5



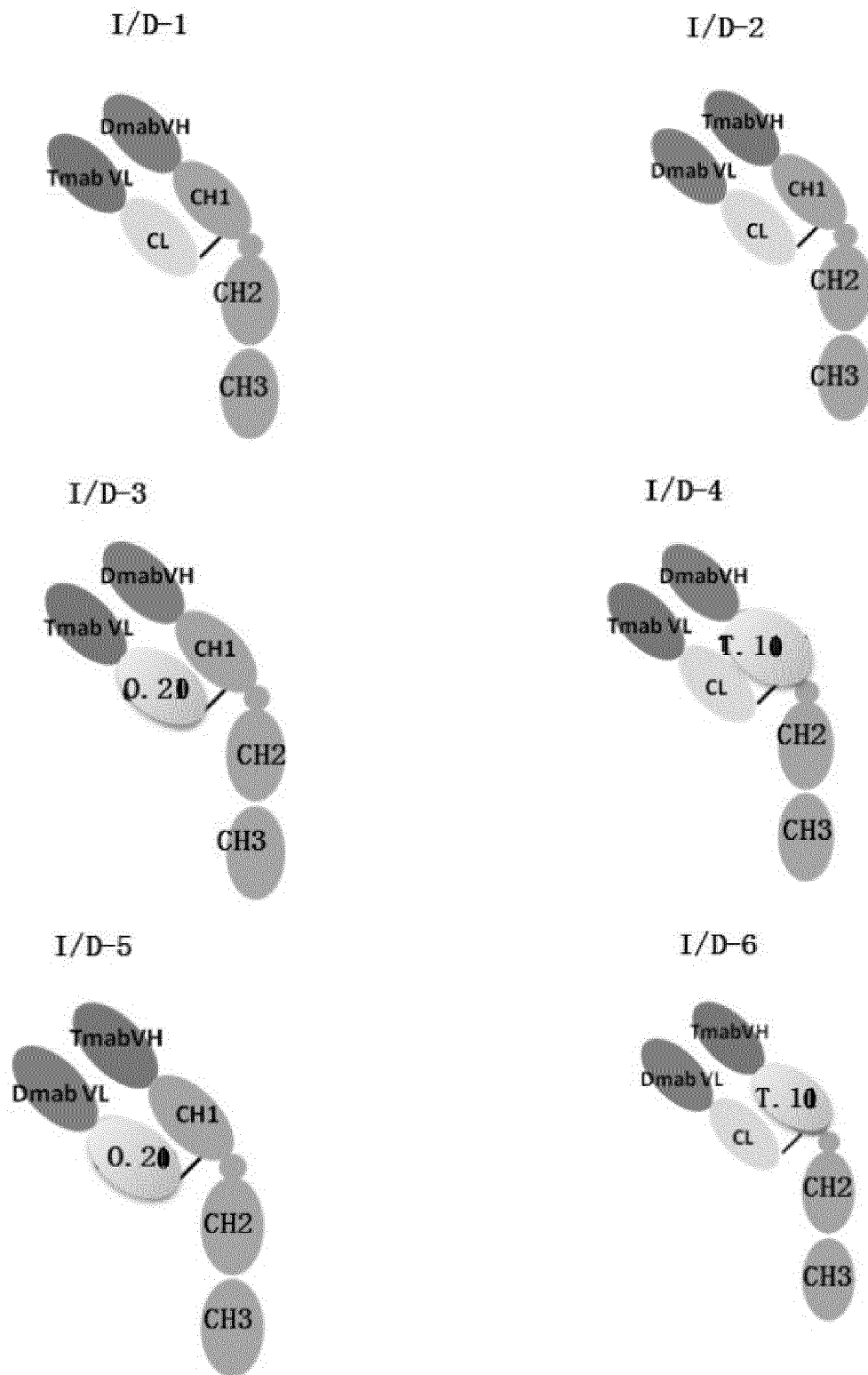
ФИГУРА 6А



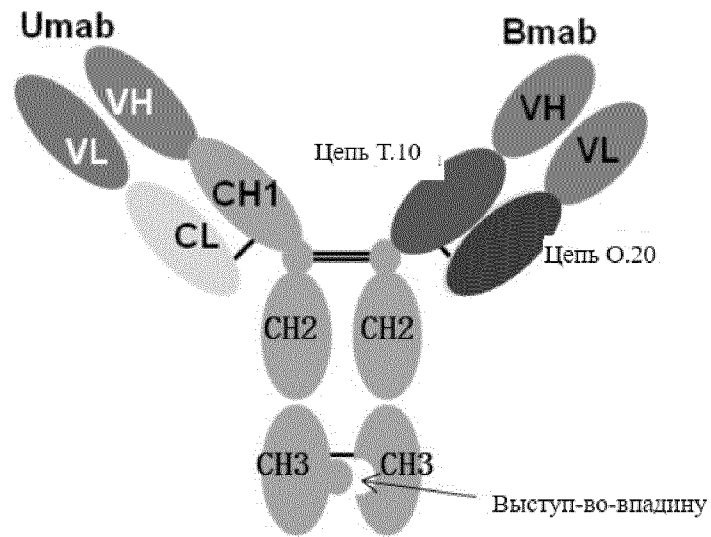
ФИГУРА 6B



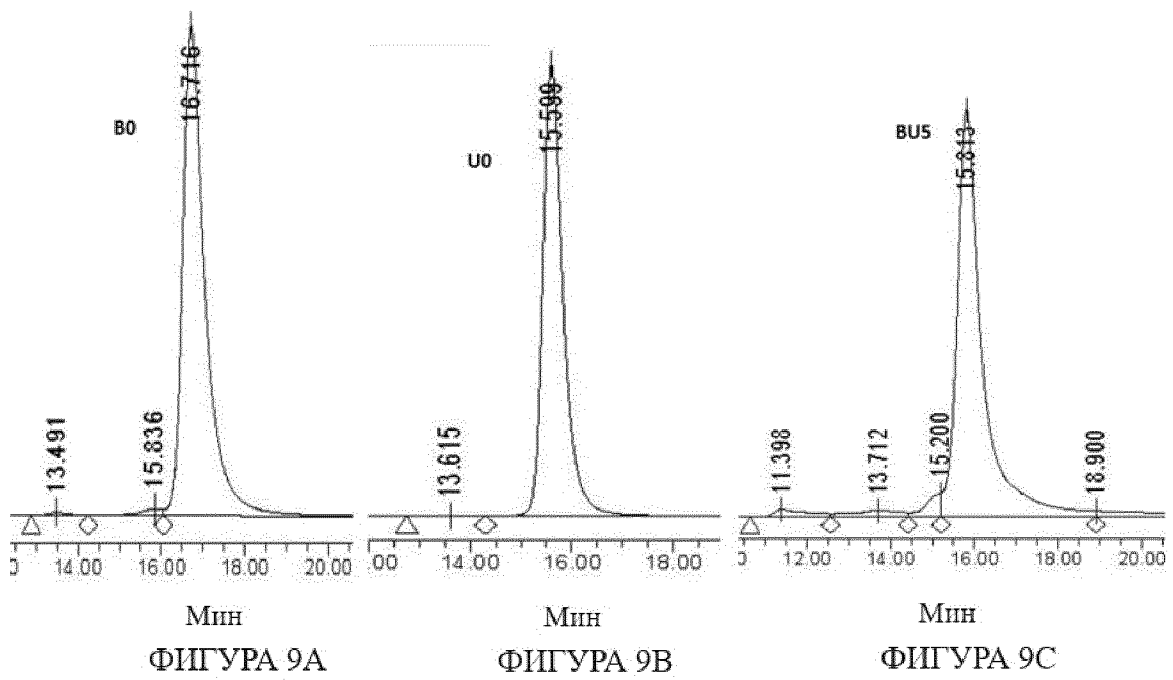
ФИГУРА 6C

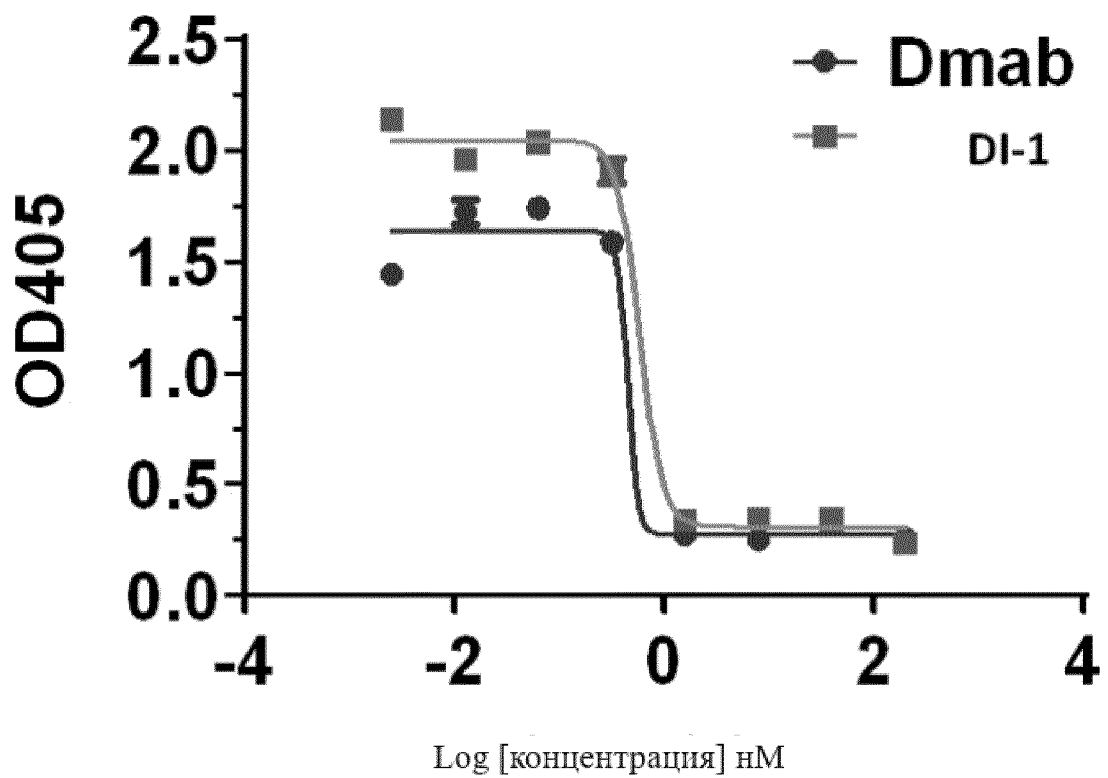


ФИГУРА 7

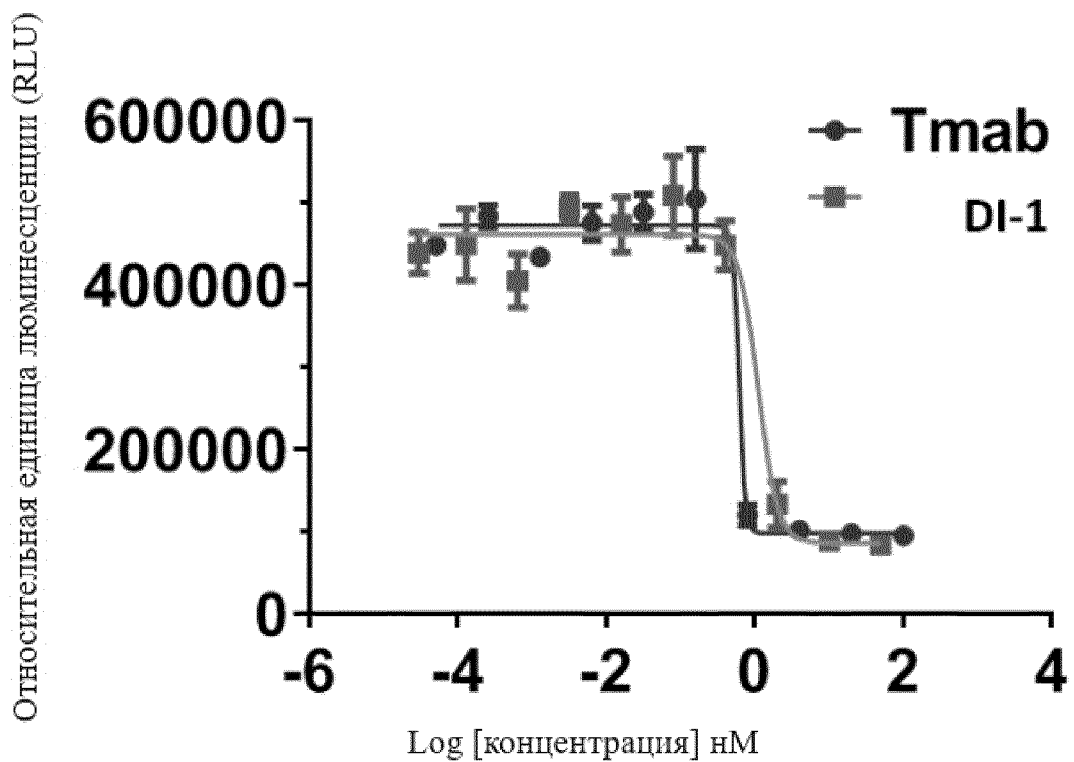


ФИГУРА 8

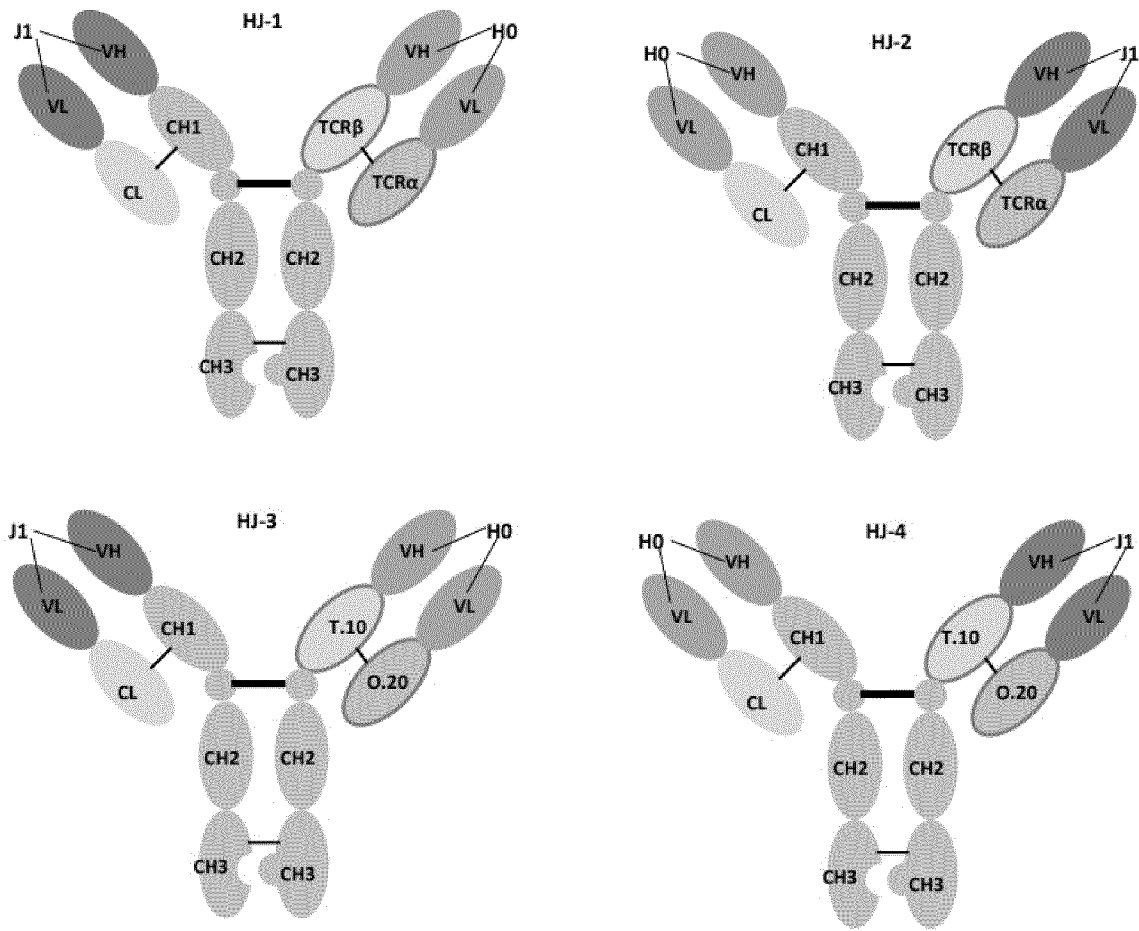




ФИГУРА 10



ФИГУРА 11



ФИГУРА 12



ФИГУРА 13А



ФИГУРА 13В

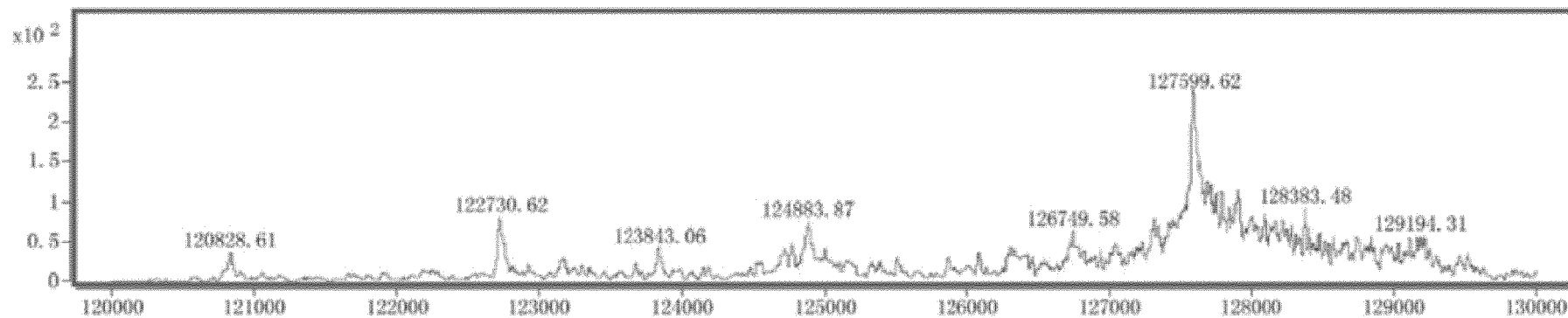




ФИГУРА 13С

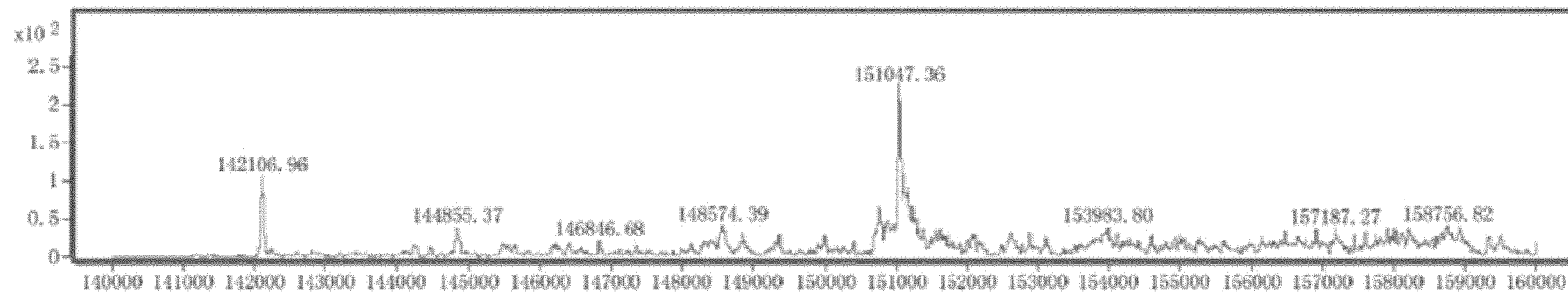


ФИГУРА 13D



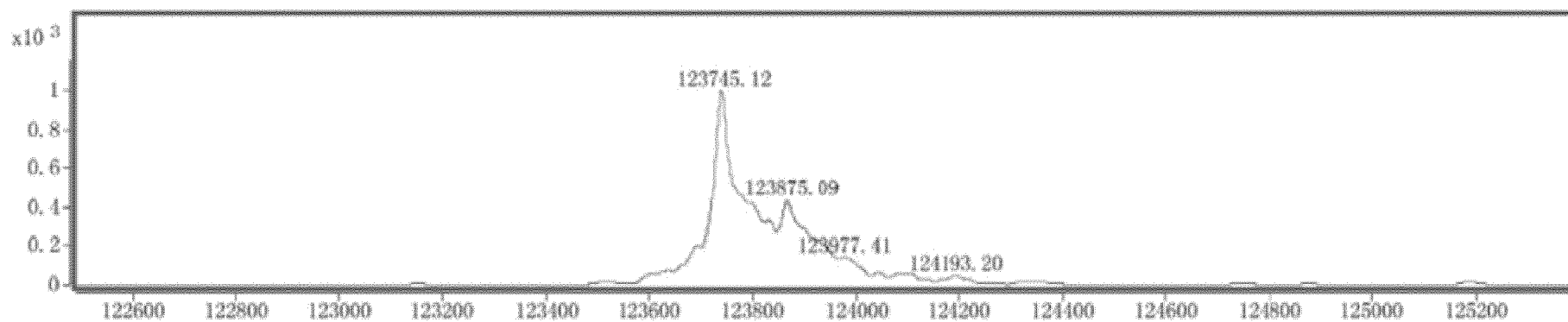
Подсчеты относительно качества деконволюции (а.е.м.)

ФИГУРА 14А



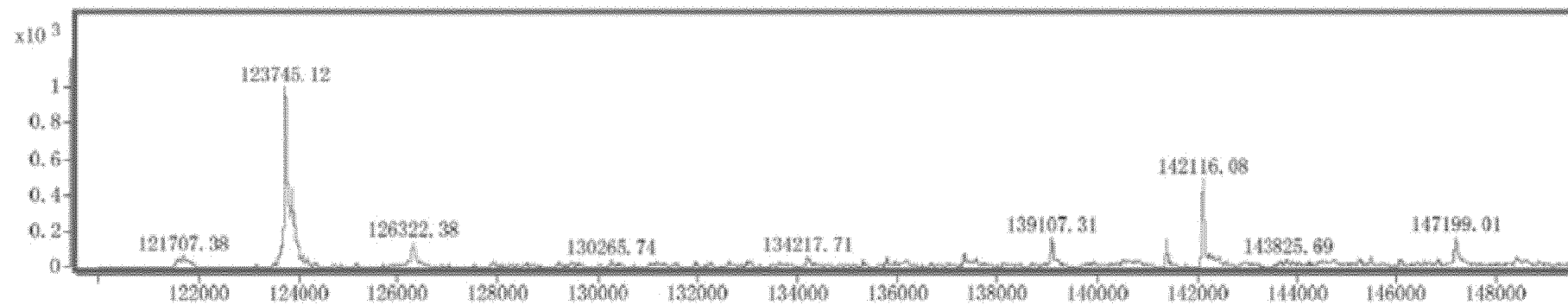
Подсчеты относительно качества деконволюции (а.е.м.)

ФИГУРА 14В



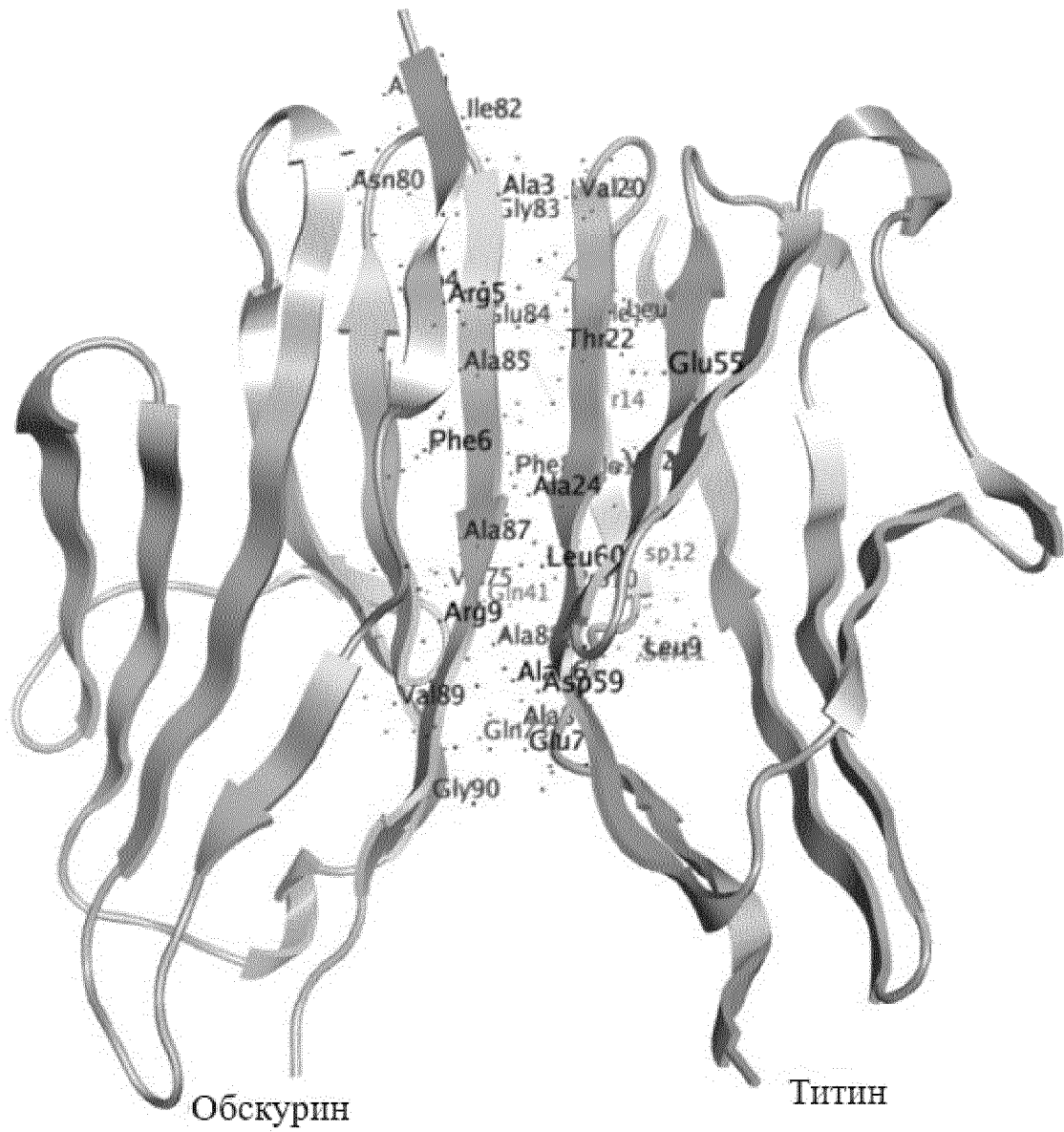
Подсчеты относительно качества деконволюции (а.е.м.)

ФИГУРА 15А

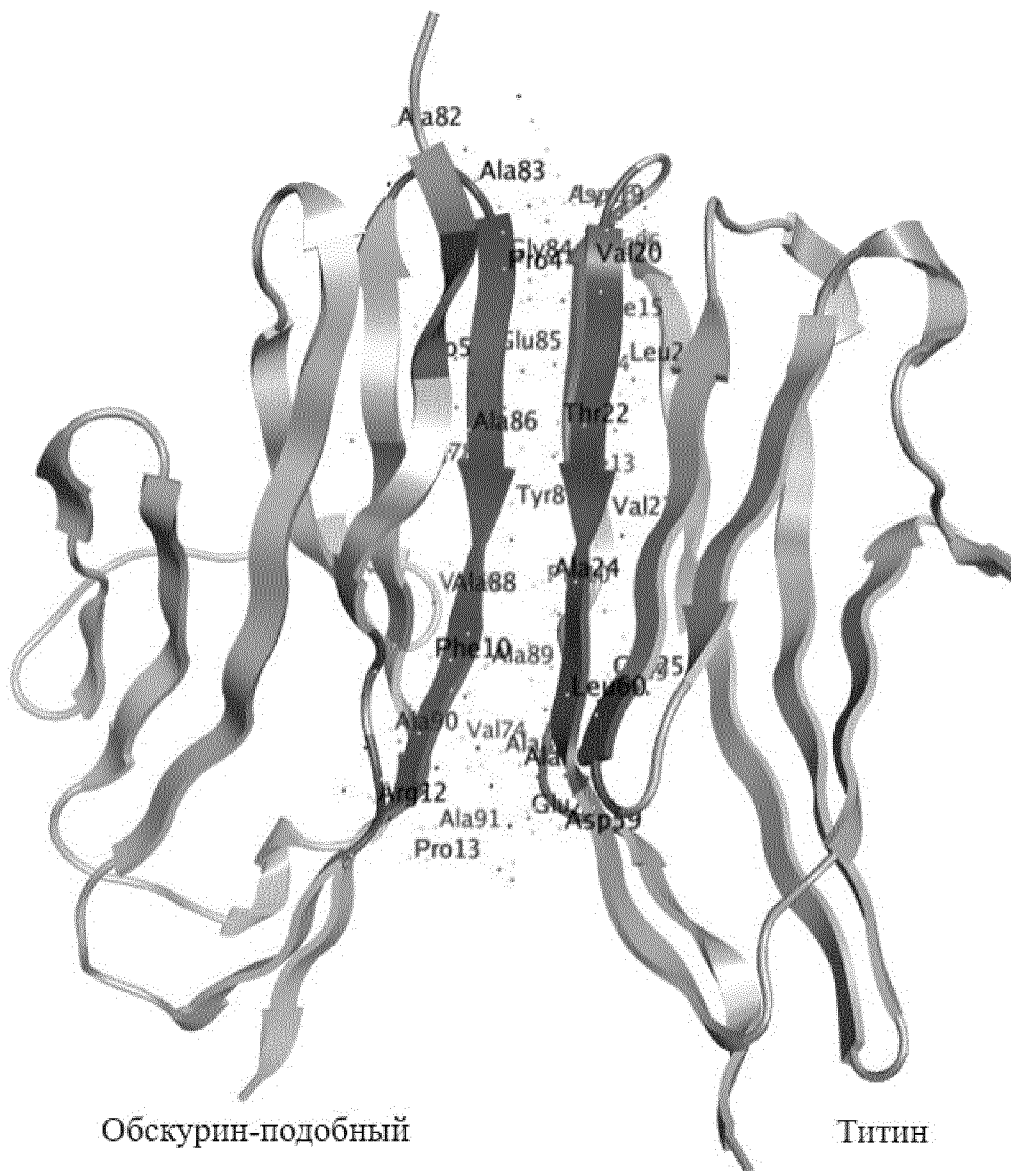


Подсчеты относительно качества деконволюции (а.е.м.)

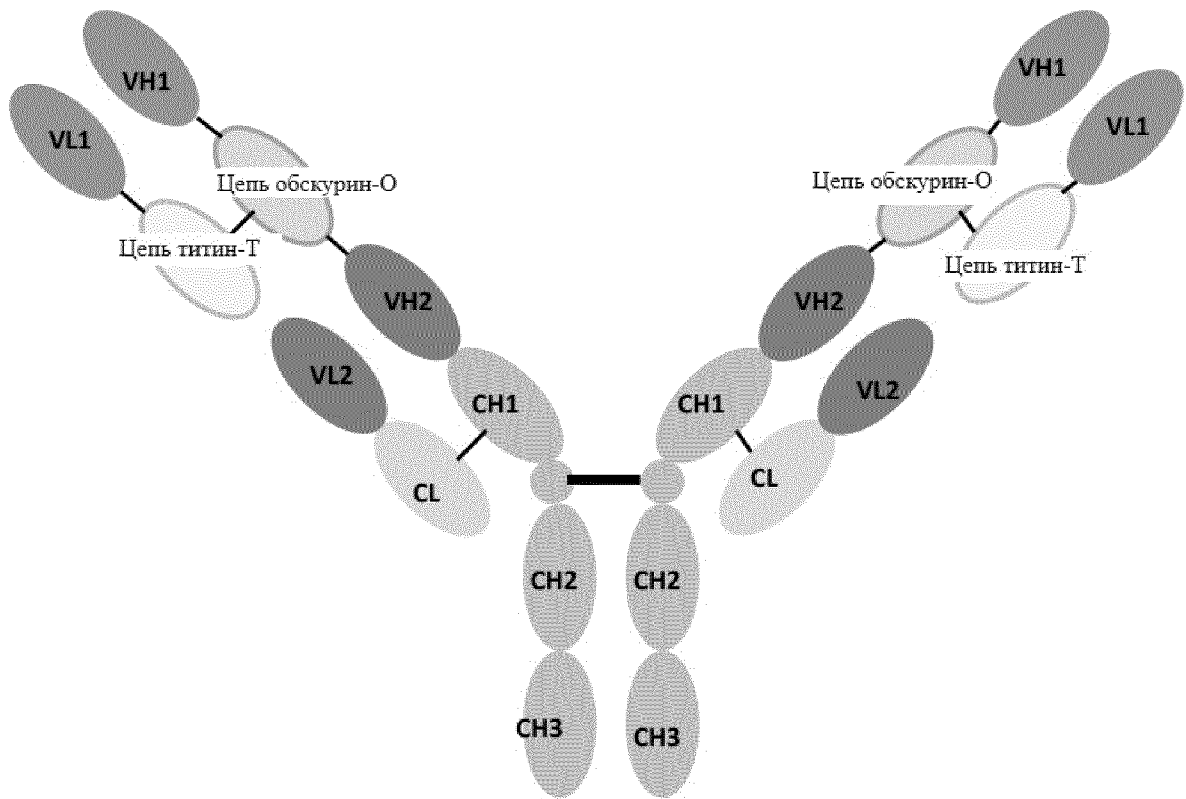
ФИГУРА 15В



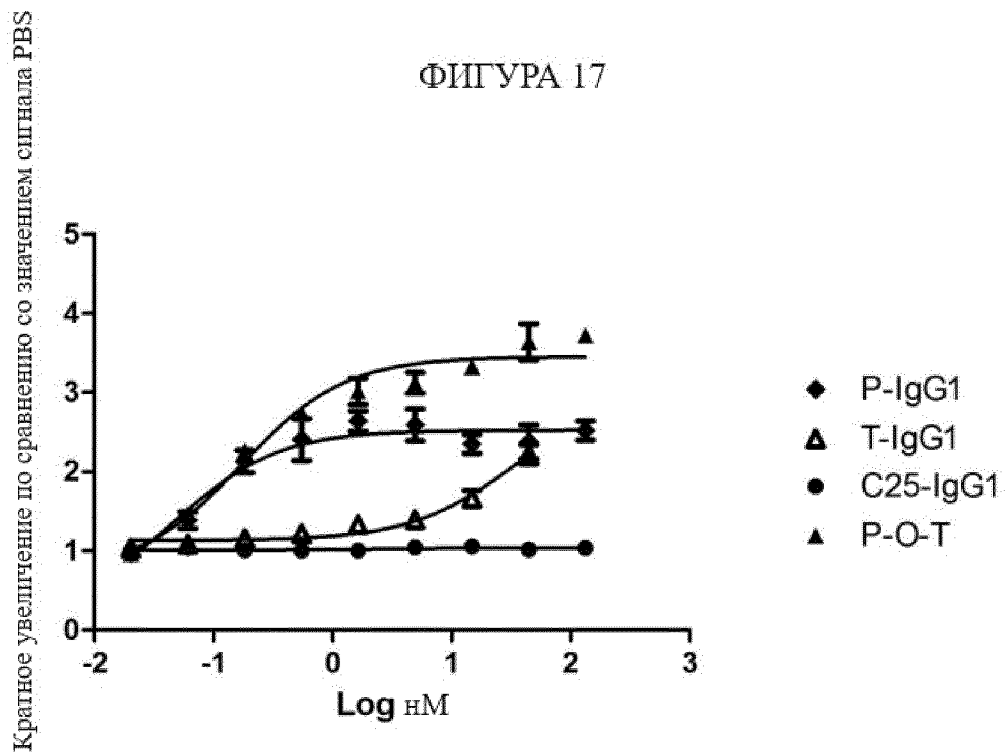
ФИГУРА 16А



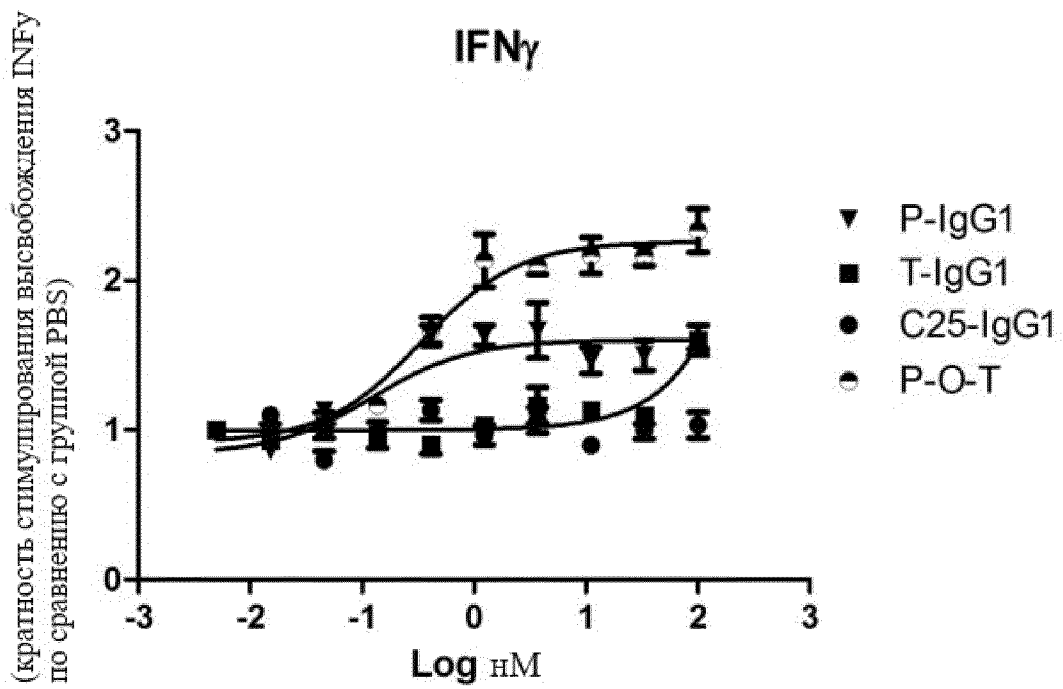
ФИГУРА 16В



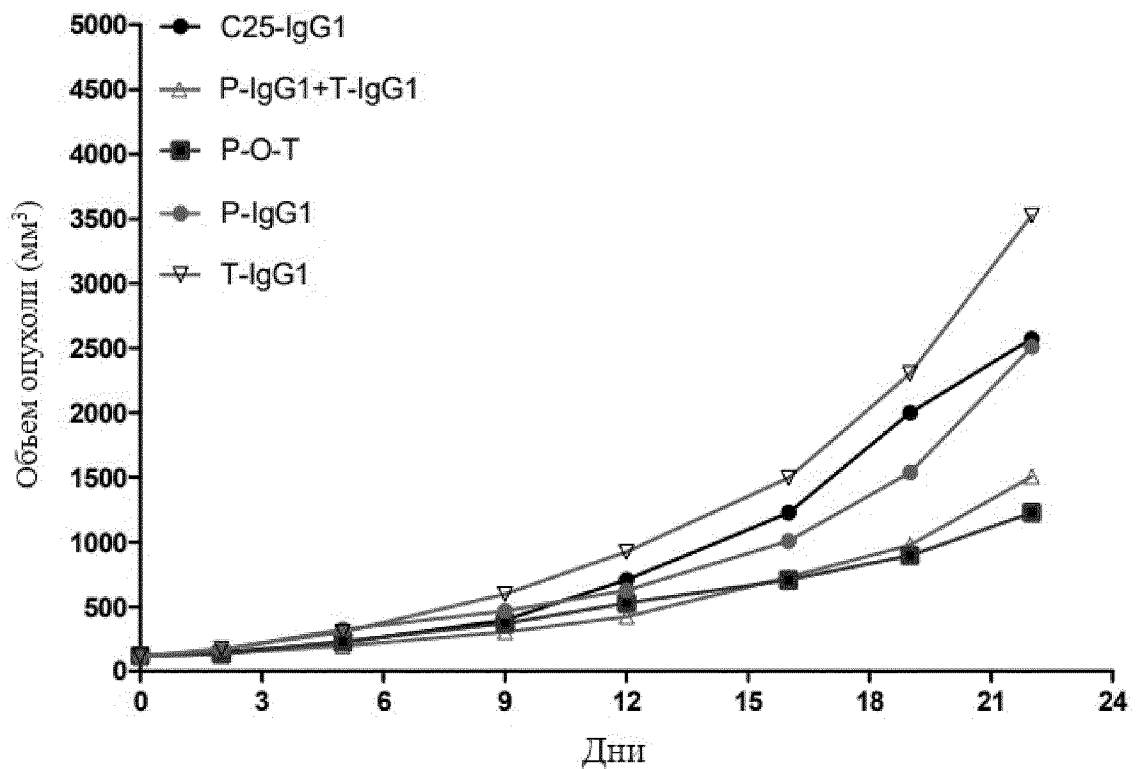
ФИГУРА 17



ФИГУРА 18



ФИГУРА 19



ФИГУРА 20