

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035319**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.05.27

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

(21) Номер заявки
201690299

(22) Дата подачи заявки
2014.07.30

(54) **СТАБИЛИЗАЦИЯ Fc-СОДЕРЖАЩИХ ПОЛИПЕПТИДОВ**

(31) **61/860,800**

(56) **US-A1-20120244578**

(32) **2013.07.31**

US-B2-7754209

(33) **US**

US-A1-20070184523

(43) **2016.11.30**

(86) **PCT/US2014/048908**

(87) **WO 2015/017548 2015.02.05**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Каннан Гунасекаран, Лавалле
Дженнифер, Джекобсен Фредерик У.
(US)**

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

(57) В изобретении предложены полипептиды, содержащие Fc-область антитела, которая имеет делецию по меньшей мере одного остатка цистеина в шарнирной области и замену по меньшей мере одной аминокислоты на поверхности домена CH3 на остаток аминокислоты, содержащий сульфгидрильную группу. Также предложены гибридные Fc-белки и антитела, содержащие такие полипептиды, нуклеиновые кислоты и векторы, кодирующие указанные полипептиды, а также клетки-хозяева и способы получения указанных полипептидов.

B1

035319

035319

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 61/860800, поданной 31 июля 2013 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка включает перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Указанная копия в формате ASCII, созданная 28 июля 2014 г., имеет название A-1852-WO-PCT_SL.txt и размер 122988 байтов.

Область техники

Антитела стали объектом, который часто используют в биофармацевтической промышленности, поскольку они обладают рядом характеристик, привлекательных для разработчиков терапевтических молекул. Помимо того, что антитела способны связываться со специфическими структурами или клетками, они делают свои мишени восприимчивыми к фагоцитозу и элиминации, опосредованных клетками, содержащими Fc-рецепторы (Raghavan and Bjorkman 1996). Кроме того, способность антитела к pH-зависимому взаимодействию с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) увеличивает период полувыведения антитела из сыворотки крови (Ghetie and Ward 2000). Указанное уникальное свойство антител позволяет увеличивать период полувыведения терапевтического белка или пептида из сыворотки посредством конструирования гибридных Fc-молекул.

Антитела принадлежат к белкам класса иммуноглобулинов, который включает IgG, IgA, IgE, IgM и IgD. Наиболее часто встречающийся подкласс иммуноглобулинов в сыворотке человека - IgG, схематическая структура которого представлена на фиг. 1 (Deisenhofer 1981; Huber 1984; Roux 1999). Структура IgG включает четыре цепи, две легких и две тяжелых; каждая легкая цепь содержит два домена, а каждая тяжелая цепь содержит четыре домена. Антигенсвязывающий сайт расположен в области Fab (Fragment antigen binding, антигенсвязывающем фрагменте), которая содержит вариабельный домен легкой (VL) и вариабельный домен тяжелой (VH) цепей, а также константный домен легкой (LC) и константный домен тяжелой (CH1) цепей. Часть тяжелой цепи, включающую шарнирную область, домен CH2 и домен CH3 называют "Fc" (кристаллизуемый фрагмент). Молекулу IgG можно рассматривать как гетеротетрамер, содержащий две тяжелые цепи, которые удерживают вместе дисульфидные связи (-S-S-) в шарнирной области, и две легкие цепи. Число дисульфидных связей в шарнирной области варьирует в разных подклассах иммуноглобулинов (Paradea and Check 1989). Сайт связывания FcRn расположен в Fc-области антитела (Martin, West et al. 2001), и соответственно характеристика антитела, заключающаяся в увеличенном периоде полувыведения из сыворотки, определяется Fc-фрагментом. Сама по себе Fc-область может рассматриваться как гомодимер тяжелых цепей, содержащий область шарнира, домены CH2 и CH3.

Fc-область встречающихся в природе антител IgG представляет собой гомодимер; и ее можно экспрессировать и очистить в виде димера. Как обсуждается выше, Fc-область антитела обеспечивает период полувыведения из сыворотки за счет механизма рециклирования FcRn. Поэтому Fc используют в качестве партнера для слияния, увеличивающего период полувыведения из сыворотки терапевтических белков, пептидов (пептител) и доменов белка. Однако для некоторых вариантов терапевтического применения может потребоваться удаление шарнирной области, устраняющее ковалентную связь между двумя полипептидными цепями, которые образуют Fc. Например, при рекомбинантном объединении Fc-области с белком, который содержит внутренние дисульфидные связи или свободные остатки цистеина, дисульфидные связи в области шарнира могут влиять на укладку и приводить к агрегации. При этом удаление шарнирной области устраняет ковалентную связь между двумя полипептидными цепями. Это может приводить к диссоциации нековалентных взаимодействий между двумя цепями Fc на этапе получения или *in vivo* и приводить к связыванию цепей Fc с другими белками/молекулами.

Краткое описание изобретения

Согласно настоящему описанию в настоящем документе введение дисульфидной связи в область контактной поверхности CH3-домена может повышать термостабильность Fc-содержащих молекул, не содержащих дисульфидных связей в составе шарнирной области. Кроме того, ковалентная связь обеспечивает интактность двух полипептидных цепей, которые образуют димер в структуре Fc, предотвращая их диссоциацию *in vitro* или *in vivo*. Как показано на фиг. 3, согласно определенным вариантам реализации, единственной ковалентной связью между двумя цепями Fc в гомодимере Fc дикого типа с удаленным шарниром и мутантном гетеродимере Fc с удаленным шарниром является указанная введенная дисульфидная связь.

Согласно определенным вариантам реализации один или более остатков, составляющих поверхность контакта CH3-CH3 на обоих доменах CH3, заменены на остаток аминокислоты, содержащий сульфгидрильную группу таким образом, что взаимодействие стабилизируется за счет формирования дисульфидной связи (-S-S-) между доменами CH3. Согласно предпочтительным вариантам реализации аминокислота указанной поверхности, такая как лейцин, треонин, серин или тирозин, заменена на цистеин или метионин, предпочтительно на цистеин. Согласно определенным вариантам реализации указанная аминокислота заменена на неприродную аминокислоту с требуемыми характеристиками заряда, та-

кую как гомоцистеин или глутатион.

Согласно первому аспекту настоящего изобретения полипептид содержит Fc-область антитела, имеющую делецию или замену одного или более остатков цистеина шарнирной области и замену одной или более аминокислот контактной поверхности СНЗ на остаток аминокислоты, содержащий сульфгидрильную группу, предпочтительно цистеин. В шарнирной области могут отсутствовать остатки цистеина в результате замены или делеции. Согласно определенным вариантам реализации шарнирная область в Fc-фрагменте отсутствует полностью. Согласно другим вариантам реализации удалена только часть шарнирной области, предпочтительно часть, содержащая остатки цистеина.

Согласно определенным вариантам реализации указанного первого аспекта аминокислота Y349, L351, S354, T394 на контактной поверхности СНЗ или Y407 заменена на остаток, содержащий сульфгидрильную группу, предпочтительно цистеин. Согласно предпочтительным вариантам реализации Fc-фрагмент содержит замену L351C. При взаимодействии в подходящих условиях двух Fc-содержащих полипептидов, имеющих замену L351C, формируется дисульфидная связь между остатками L351C в двух цепях. Аналогичным образом, при взаимодействии в подходящих условиях двух Fc-содержащих полипептидов, имеющих замену T394C, формируется дисульфидная связь между остатками T394C в двух цепях. Кроме того, при взаимодействии в подходящих условиях двух Fc-содержащих полипептидов, имеющих замену Y407C, формируется дисульфидная связь между остатками Y407C в двух цепях. При взаимодействии в подходящих условиях Fc-содержащего полипептида, имеющего замену Y349C, с Fc-содержащим полипептидом, имеющим замену S354C, формируется дисульфидная связь между остатком Y349C одной цепи и остатком S354C другой цепи.

Fc-область полипептида согласно первому аспекту может включать одну или большее количество дополнительных замен аминокислот в области СН2 и/или СНЗ. Согласно предпочтительным вариантам реализации Fc в области СН2 включает одну или более замен аминокислот, изменяющих эффекторную функцию Fc-содержащего белка по сравнению с аналогичным белком, содержащим СН2 дикого типа. Согласно другим вариантам реализации Fc в области СНЗ включает одну или более замен аминокислот, изменяющих способность Fc-содержащего полипептида к гомодимеризации и/или увеличивающих способность к гетеродимеризации с Fc-содержащим полипептидом, содержащим реципрокные замены аминокислот в области СНЗ.

Согласно определенным вариантам реализации указанного первого аспекта удалены или заменены одна или большее количество аминокислот на С-конце Fc-области. Согласно предпочтительным вариантам реализации С-концевой лизин удален или заменен на другую аминокислоту. Согласно другим вариантам реализации две или три концевые аминокислоты удалены или заменены на другую аминокислоту.

Согласно определенным вариантам реализации указанного первого аспекта указанный полипептид представляет собой тяжелую цепь антитела. Согласно другим вариантам реализации указанный полипептид представляет собой гибридный Fc-белок. Указанный гибридный Fc-белок может содержать линкер на N-конце и/или С-конце молекулы Fc.

Во втором аспекте настоящего изобретения нуклеиновая кислота кодирует полипептид согласно указанному первому аспекту.

В третьем аспекте экспрессионный вектор содержит нуклеиновую кислоту согласно указанному второму аспекту, функционально связанную с регуляторной последовательностью, такой как гетерологичный промотор и/или энхансер.

В четвертом аспекте клетка-хозяин содержит экспрессионный вектор согласно указанному третьему аспекту. Согласно предпочтительным вариантам реализации указанная клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, например дрожжевую клетку или клетку линии клеток млекопитающих. Предпочтительной линией клеток млекопитающих является линия клеток яичника китайского хомячка (CHO).

Пятый аспект настоящего изобретения представляет собой способ получения полипептида согласно указанному первому аспекту. Предложенные способы включают культивирование клетки-хозяина согласно указанному четвертому аспекту в условиях, при которых активна регуляторная область в указанной клетке-хозяине, и выделение указанного полипептида из культуры.

Согласно шестому аспекту фармацевтическая композиция содержит полипептид согласно указанному первому аспекту.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - схематическое изображение антитела IgG1 с указанием доменов. Антитело IgG1 представляет собой Y-образный тетрамер, содержащий две тяжелых цепи (большой длины) и две легких цепи (меньшей длины). Указанные две тяжелых цепи соединены между собой дисульфидными связями (-S-S-) в шарнирной области. Fab - антигенсвязывающий фрагмент, Fc - кристаллизуемый фрагмент, VL - вариабельный домен легкой цепи, VH - вариабельный домен тяжелой цепи, CL - константный (без вариаций последовательности) домен легкой цепи, CH1 - константный домен тяжелой цепи 1, CH2 константный домен тяжелой цепи 2, CH3 - константный домен тяжелой цепи 3.

Фиг. 2 - схемы димеров Fc, в которых отсутствует шарнирная область ("удаленный шарнир"), с введенной дисульфидной связью в область контактной поверхности СНЗ-домена, (а) в случае гомодимера

Fc дикого типа и (b) в случае мутантного гетеродимера Fc, где также были введены мутации (например, мутации типа "выступы-во-впадины" или мутации пар заряженных остатков) в область контактной поверхности СНЗ-домена.

Фиг. 3 - ДСН-ПААГ-электрофорез, дающий основную одиночную полосу, подтверждающую наличие ковалентной связи между положительно заряженными ("+") и отрицательно заряженными ("-") цепями Fc для гибридной конструкции гетеродимера Fc с мутацией пар заряженных остатков и удаленным шарниром с введенной дисульфидной связью L351C в область контактной поверхности СНЗ-домена.

Фиг. 4 - обзор фармакокинетики гетеродимерных (с мутациями пар заряженных остатков) гибридных Fc-белков, в которых отсутствует шарнирная область. А - Fc-гибрид без шарнира и без линкера между терапевтическим пептидом и Fc. В - то же, что и А, за исключением вариации в терапевтическом пептиде. С - то же, что и В, за исключением того, что Fc соединен с терапевтическим пептидом посредством негликозилированного линкера. D - то же, что и С, за исключением другого линкера. Е - то же, что и А, за исключением того, что одна цепь Fc включает замену Y349C, а другая включает замену S354C. F - то же, что и В, за исключением того, что одна цепь Fc включает замену Y349C, а другая включает замену S354C.

Подробное описание изобретения

В настоящем документе описаны способы повышения стабильности Fc-каркасов антител, в частности Fc-каркасов, не содержащих шарнирной области, не содержащих части шарнирной области, образующей дисульфидные связи, или отличающихся тем, что их шарнирная область включает замену одного или большего количества остатков цистеина. Такие способы включают введение одной или большего числа сконструированных дисульфидных связей в область контактной поверхности СНЗ-домена.

Как видно на фиг. 1, антитело IgG1 представляет собой Y-образный тетрамер с двумя тяжелыми цепями (большей длины) и двумя легкими цепями (меньшей длины). Указанные две тяжелых цепи соединены между собой дисульфидными связями (-S-S-) в шарнирной области. Молекулу IgG можно считать гетеротетрамером, состоящим из двух тяжелых цепей, удерживаемых вместе дисульфидными связями (-S-S-) в шарнирной области, и двух легких цепей. Число дисульфидных связей в шарнире в подклассах иммуноглобулинов варьирует.

Ковалентную связь между двумя тяжелыми цепями во встречающихся в природе антителах обеспечивают дисульфидные связи в шарнирной области (контактирующей с растворителем). Соответственно в димере Fc или антителе, не содержащем шарнирной области, ковалентная связь между двумя тяжелыми цепями отсутствует. Дисульфиды шарнирной области, наряду с дисульфидной связью между легкими и тяжелыми цепями (CL-CH1), удерживают все четыре цепи в ковалентно связанном состоянии. Молекулярная масса интактного антитела составляет приблизительно 150 кДа, и оно образует одну полосу при анализе способом невосстанавливающего ДСН-ПААГ-электрофореза. Дисульфидная связь в области контактной поверхности СНЗ-домена в IgG1/Fc дикого типа (WT) отсутствует.

Примером последовательности аминокислот IgG1 Fc человека является

```
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQP
REPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 9)
```

В приведенной выше последовательности DKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 10) соответствует шарнирной области.

Аминокислоты, составляющие поверхность контакта СНЗ-СНЗ, описаны в следующих предварительных заявках того же заявителя: 61/019569, поданной 1/7/2008, и 61/120305, поданной 12/5/09, а также PCT/US2009/000071, поданной 1/6/2009 (все указанные источники полностью включены в настоящий документ посредством ссылки).

Всего было идентифицировано 48 кристаллических структур антител с координатами, соответствующими Fc-области из Базы данных белковых структур (PDB) (Bernstein, Koetzle et al. 1977), с применением алгоритма поиска на основе структуры (Ye and Godzik 2004). Исследование идентифицированных кристаллических структур Fc показало, что структура, определенная при максимальном разрешении, соответствует Fc-фрагменту ритуксимаба, связанному с минимизированным вариантом В-домена белка А, называемым Z34C (код PDB: 1L6X). Биологическую структуру гомодимера Fc для 1L6X устанавливали с использованием координат и кристаллической симметрии осажденного мономера Fc. Для идентификации остатков, участвующих во взаимодействии СНЗ-СНЗ-доменов, использовали два способа: (i) контактный способ, основанный на критерии предельного расстояния, и (ii) анализ площади, доступной для растворителя на поверхности.

В соответствии с контактным способом остатки на поверхности по определению представляют собой остатки, тяжелые атомы боковых цепей которых расположены ближе установленного предела к тяжелым атомам любых остатков второй цепи. Хотя предельное расстояние 4,5А является предпочтительным, для идентификации остатков контактной поверхности можно использовать и большее предельное расстояние (например, 5,5А) (Bahar and Jernigan 1997).

Второй способ включает вычисление площади доступной для растворителя поверхности (ASA) ос-

татков СНЗ-домена в присутствии и в отсутствие второй цепи (Lee and Richards 1971). Остатки, демонстрирующие разную ASA ($>1 \text{ \AA}^2$) в двух расчетах, идентифицируют как остатки контактной поверхности. С помощью обоих способов был идентифицирован аналогичный набор остатков поверхности контакта. Кроме того, полученные данные согласовались с опубликованным исследованием (Miller 1990).

В таблице приведены 24 остатка поверхности контакта, идентифицированные с применением критерия контактного способа при пределе расстояния 4,5Å. Дополнительно исследовали консервативность структуры указанных остатков. С указанной целью 48 идентифицированных в PDB кристаллических структур Fc совмещали и анализировали путем вычисления среднеквадратичного отклонения для тяжелых атомов боковых цепей. Обозначения остатков основаны на системе нумерации EU по Kabat, соответствующей также нумерации в Базе данных белковых структур (PDB).

Остатки контактной поверхности цепи А	Остатки контактной поверхности цепи В
GLN A 347	LYS B 360'
TYR A 349	SER B 354' ASP B 356' GLU B 357' LYS B 360'
THR A 350	SER B 354' ARG B 355'
LEU A 351	LEU B 351' PRO B 352' PRO B 353' SER B 354' THR B 366'
SER A 354	TYR B 349' THR B 350' LEU B 351'
ARG A 355 ^b	THR B 350'
ASP A 356	TYR B 349' LYS B 439'
GLU A 357	TYR B 349' LYS B 370'
LYS A 360 ^b	GLN B 347' TYR B 349'
SER A 364	LEU B 368' LYS B 370'
THR A 366	LEU B 351' TYR B 407'
LEU A 368	SER B 364' LYS B 409'
LYS A 370	GLU B 357' SER B 364'
ASN A 390	SER B 400'
LYS A 392	LEU B 398' ASP B 399' SER B 400' PHE B 405'
THR A 394	THR B 394' VAL B 397' PHE B 405' TYR B 407'
PRO A 395	VAL B 397'
VAL A 397	THR B 393' THR B 394' PRO B 395'
ASP A 399	LYS B 392' LYS B 409'
SER A 400	ASN B 390' LYS B 392'
PHE A 405	LYS B 392' THR B 394' LYS B 409'
TYR A 407	THR B 366' THR B 394' TYR B 407' SER B 408' LYS B 409'
LYS A 409	LEU B 368' ASP B 399' PHE B 405' TYR B 407'
LYS A 439	ASP B 356'

Определяли кристаллическую структуру Fc дикого типа и анализировали ее на наличие потенциальных положений для введения остатков цистеина для сконструированной дисульфидной связи. В частности, были выбраны остатки T394 и L351. Остатки T394 цепей Fc дикого типа расположены рядом в области контактной поверхности СНЗ-домена. Мутация с заменой T394 на цистеин в обеих цепях Fc обеспечивает образование дисульфидной связи. Аналогичным образом, остатки L351 цепей Fc дикого типа расположены рядом в области контактной поверхности СНЗ-домена. Мутация с заменой L351 на цистеин в обеих цепях Fc также обеспечивает образование дисульфидной связи. Мутация с заменой на цистеин как T394, так и L351 в обеих цепях Fc обеспечивает образование двух дисульфидных связей.

Поскольку в дисульфидной связи задействованы одни и те же остатки на обеих цепях, как положение T394, так и L351 подходит для применения в случае гомодимеров Fc дикого типа, а также сконструированных гетеродимеров Fc, таких как цепи Fc с мутациями типа "выступы-во-впадины" или мутациями пар заряженных остатков.

Положения Y349 и S354 расположены рядом на контактной поверхности СНЗ Fc дикого типа. В гетеродимере Fc одна область СНЗ может включать замену Y349C, а другая СНЗ область может включать замену S354C. Было обнаружено, что стабильность гетеродимеров с парами заряженных остатков, содержащих мутации типа "цистеиновый зажим" (Y349C/S354C), выше, чем у гетеродимеров, не содержащих цистеиновый зажим. В частности, мономеры гетеродимеров с парами заряженных остатков без цистеинового зажима были представлены в виде отдельных полос на ДСН-ПААГ, тогда как гетеродимеры с парами заряженных остатков с мутацией типа "цистеиновый зажим" были представлены в виде одной полосы. То же самое было справедливо и для гетеродимеров с парами заряженных остатков, содержащих (L351C/L351C) мутацию типа "цистеиновый зажим".

Гетеродимеры, содержащие первую СНЗ-содержащую молекулу, включающую замену Y349C, и вторую СНЗ-содержащую молекулу, включающую замену S354C, демонстрировали более высокую стабильность и более высокий процент гетеродимеров по сравнению с содержащими в указанных положе-

ниях остатки аминокислот дикого типа. Кроме того, гетеродимеры, содержащие первую и вторую СНЗ-содержащую молекулу, каждая из которых включала замену L351C, демонстрировали более высокую стабильность и более высокую продуктивность, чем содержащие L351 молекулы.

Остатки контактной поверхности в составе домена СНЗ демонстрируют тенденцию к высокой консервативности в различных подклассах и классах антител, и даже у разных видов. Соответственно, хотя предложенные варианты реализации относятся к IgG1 человека, конструирование с использованием цистеинов подходит и для других Fc-содержащих молекул. Примеры последовательностей Fc представлены ниже. Остатки, соответствующие Y349, L351, S354, T394 или Y407 IgG1 человека в составе приведенных ниже последовательностей, могут быть заменены на содержащий сульфидрил остаток, предпочтительно цистеин. Соответствующие остатки IgG человека других подклассов выделены жирным шрифтом.

>IGHG1 человека (SEQ ID NO: 11)

PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>IGHG2 человека (SEQ ID NO: 12)

RKCCVCEPCPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIKTK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>IGHG3 человека (SEQ ID NO: 13)

LKTPLDGDTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQ
FKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTT
PMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHRTQKSLSLSPGK

>IGHG4 человека (SEQ ID NO: 14)

SKYGPCCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVD
DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKSKA
KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

>IGHG1 мыши (SEQ ID NO: 15)

VPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVLITITLTPKVTCCVVVDISKDDPEVQFSWFVD
DVEVHTAQTPREEQFNSTFRVSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAPPAPIEKTIKTK
GRPKAPQVYTI PPPKQMAKDKVSLTCMITDFPEDI TVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNT
NGSYFVYKLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKLSLHSPGK

>IGHG2A мыши (SEQ ID NO: 16)

DKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDD
PDVQISWVFNNEVHTAQTPQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMGKEFKCKVNNKDLPA
PIERTISKPKGVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVDTFMPEDIYVEWTNNGKTELN
YKNTPEVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

>IGHG2B мыши (SEQ ID NO: 17)

EPSPGISTINPCPPCKECHKCPAPNLEGGPSVFI FPPNIKDVLMI SLPKVTCCVVVDVSE
DDPDVQISWVFNNEVHTAQTPQTHREDYNSTIRVVSALPIQHQQDWMGKEFKCKVNNKDL
PSPIERTISKIKGLVRAPQVYVLPPEAEQLSRKDVSLTCLVVGFPNGDISVEWTSNGHTE
ENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKLNMTSKWEKTD SFCNVRHEGLKNYYLKKTI SRSPGK

>IGHG2C мыши (SEQ ID NO: 18)

EPRVPI TQNPCPLKECPPCAAPDLLGGPSVFI FPPKIKDVLMI SLSPMVTCVVVDVSEDD
DPDVQISWVFNNEVHTAQTPQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMGKEFKCKVNNRALP
SPIEKTIKPRGVRAPQVYVLPPEAEEMTKKESLTCMITGFLPAEIAVDWTSNGRTEQ
NYKNTATVLDSDGSYFMYSKLRVQKSTWERGSLFACSVVHEVLHNHHTTKTISRSLGK

>IGHG3 мыши (SEQ ID NO: 19)

EPRIKPKSTPPGSSCPPGNILGGPSVFI FPPKPKDALMISLTPKVTCCVVVDVSEDDPDVH
VSWFVDNKEVHTAQTPREAQYNSTFRVVSALPIQHQQDWMRGKEFKCKVNNKALPAPIER
TISKPKGRAQTPQVYTI PPPREQMSKKVSLTCLVTNFFSEAI SVEWERNGELEQDYKNT
PPILDSGTYFLYSKLTVDTSWLQGEI FTCSVVHEALHNHHTQKNLSRSPGK

>IGHG1 овцы (SEQ ID NO: 20)

EPGCPDCKHCRCPPPELPGGPSVFI FPPKPKDTLTISGTPEVTCVVVDVGGDDPEVQFS
WFDNVNVEVHTARTKPREEQFNSTFRVVSALPIQHQQDWTTGGKEFKCKVHNEALPAPIVRTI
SRTKGQAREPQVYVLPPEEELSKSTLSVTCLVTGFYPDYIAVEWQKNGQPESEDKYGTT
TSQLDADGSYFLYSRLRVDKNSWQEGD TYACVMHEALHNHYTQKSIKPPGK

>IGHG2 овцы (SEQ ID NO: 21)

GISSDYSKCSKPPCVSRPSVFI FPPKPKDLSLMTGTPEVTCVVVDVQGDPEVQFSWFVDN
VEVRTARTKPREEQFNSTFRVVSALPIQHHDWTTGGKEFKCKVHSGGLPAPIVRTISRAGK

QAREPQVYVLAPPQEELSSTLSVTLVTFYFDYIAVEWQRARQPESEDKYGTTSQLD
ADGSYFLYSRLRVDKSSWQRGDTYACVVMHEALHNHYTQKSIKPPGK
>IGHG1 коровы (SEQ ID NO: 22)
DFTCKPSPDCPPPELPGGSPVFI FPPKPKDTLTISGTPEVTCVVVDVGHDDPEVKFSW
FVDDVEVNTATTKPREEQFNSTYRVVSALRIQHQDWTGGKEFKCKVHNEGLPAPIVRTIS
RTKGAPREPQVYVLAPPQEELSSTLSVTLVTFYFDYIAVEWQRARQPESEDKYGTTP
PQLDADSSYFLYSKLRVDRNSWQEGDTYTCVVMHEALHNHYTQKSTKSAGK
>IGHG2 коровы (SEQ ID NO: 23)
GVSSDCSKPNNQHCVRPESVFI FPPKPKDLMITGTPEVTCVVNVGHNDPEVQFSWFV
DDVEVHTARTKPREEQFNSTYRVVSALPIQHQDWTGGKEFKCKVNIKGLSASIVRIISRS
KGPAREPQVYVLDPKPEELSSTVSVTCMVGIFYPEDVDVEWQRDRQTESEDKYRTTPPQ
LDADRSYFLYSKLRVDRNSWQRGDTYTCVVMHEALHNHYMQKSTKSAGK
>IGHG3 коровы (3) (SEQ ID NO: 24)
KSEVEKTPCQCSKCEPLGGLSVFI FPPKPKDTLTISGTPEVTCVVVDVGGDDPEVQFSW
FVDDVEVHTARTKPREEQFNSTYRVVSALRIQHQDWTGGKEFKCKVNNKGLPAPIVRTIS
RTKGAPREPQVYVLAPPREELSSTLSLTLITGFYPEEIDVEWQRNGQPESEDKYHTTA
PQLDADGSYFLYSKLRVKNSSWQEGDHYTCAMHEALRNHYKEKSISSPGK
>IGHG1 крысы (SEQ ID NO: 25)
VFRNCGGCKPCICTGSEVSSVFI FPPKPKDVLITLTPKVTCVVVDISQDDPEVHFSWF
VDDVEVHTAQTRPPEEQFNSTFRVSELPIHQDNLNGRTFRCKVTSAAFPSPIEKTIK
PEGRTPVPHVYTMSPTEKEMTQNEVSI TCMVKGFYPPDIYVEWQMNQOQENYKNTPTMT
DIDGSYFLYSKLRVKNSSWQEGDHYTCAMHEALRNHYKEKSISSPGK
>IGHG2A крысы (SEQ ID NO: 26)
VFRNCGGCKPCICTGSEVSSVFI FPPKPKDVLITLTPKVTCVVVDISQNDPEVRFWSFIDV
EVHTAQTHAPEKQSNSTLRSVSELPVHRDNLNGRTFRCKVNSGAFPAIEKSIKPEGT
PRGPQVYTMAPPKEEMTQSQVSI TCMVKGFYPPDIYVEWQMNQOQENYKNTPTMTDIDG
SYFLYSKLRVKNSSWQEGDHYTCAMHEALRNHYKEKSISSPGK
>IGHG2B крысы (SEQ ID NO: 27)
ERRNGGIGHKCPCTCPTCHKCPVPELLGGSPVFI FPPKPKDILLISQNAKVTVVVDVSEE
EPDVQFSWFVNNVEVHTAQTRPPEEQFNSTFRVVSALPIQHQDWMGKEFKCKVNNKALP
SPIEKTISKPKGLVRKQVYVMGPPTEQLTEQVSLTCLTSGFLPNDIGVEWTSNGHIEK
NYKNTPEVMDSDGSFFMYSKLNVERSRWDRAPFVCSVVEGLHNHHVEKSISSPPGK
>IGHG кролика (SEQ ID NO: 28)
AFSTCSKPTCPPELGGSPVFI FPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSEDDPEVQFTWYI
NNEQVTRARPPLEQQFNSTIRVVSALPIQHQDWMGKEFKCKVNNKALPAPIEKTIKSA
RGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMVGIFYPSDISEVEKNGKAEDNYKTPAVLD
SDGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDTVTCVVMHEALHNHYTQKSISSPGK
>IGHG1 лошади (SEQ ID NO: 29)
EPIPNHQKVCDSKCPKCPAPELGGSPVFI FPPKPKDLMITRTPEVTCVVVDVQEN
PDVKFNWYMDGVEVRTATTRPKEEQFNSTYRVVSLRIQHQDWSGKEFKCKVNNQALPQ
PIERTITKTKGRSQEPQVYVLAPHPDEDSKSKVSVTLVKDFYPPDIYVEWQSNQOPELE
TKYSTTQAQQSDGSYFLYSKLSVDRNRWQGGTFTTCGMHEALHNHYTQKNVSKNPKG
>IGHG2 лошади (SEQ ID NO: 30)
ARVTPVCSLCRGRYPHPIGGSPVFI FPPKPKDALMISRTPEVTCVVVDVNSDQYPDVQFSW
YVDNTEVHSAITKQREAFNSTYRVVSVLPIQHQDWSGKEFKCSVTNVGVPQISRAIS
RGKGPSRVPQVYVLPPHPDELAKSKVSVTLVKDFYPPDIYVEWQSNRWPELEGKYSTTP
AQLDGDGSYFLYSKLSLETSRWQVESFTCAVMHEALHNHYTQKSISSPGK
>IGHG3 лошади (SEQ ID NO: 31)
EPVLPKPTTAPVPLTTPVPEVTTTPCPECPKCPAPELGGSPVFI FPPKPKDVLMI
TRTPEVTCVVVDVSHDSSDLFTWYVDGTEVKTAKTMPNEEQNNSTYRVVSLRIQHQD
LNGKFKCKVNNQALPAPVERTISKATGQTRVPQVYVLAPHPDELAKSKVSVTLVKDFL
PTDITVEWQSNHPEPEGKYRTTEAQKSDGSYFLYSKLTVEVTRWQGGTFTTCVVMHEA
LHNHYMQKNVSHSPGK
>IGHG4 лошади (SEQ ID NO: 32)
VIKCGGCTCPECLSVGSPVFI FPPKPKDVLMIISRTPEVTCVVVDVGHDFPDVQFNWYV
DGVETHATTEPKQEQNNSTYRVVSLAIQHDKDWSGKEFKCKVNNQALPAPVQKTIKSP
TGQPREPQVYVLAPHRAELSKNKVSVTLVKDFYPTDIDIEWKSNGQPEPETKYSTTAPQ
LSDGSYFLYSKLTVEVTRWQGGTFTCAVMHEALHNHYTEKSVSKSPGK
>IGHG5 лошади (SEQ ID NO: 33)
VVKGSPCKCPAPELGGSPVFI FPPKPKDVLKISRKPEVTCVVVDLGHDDPDVQFTWV
DGVETHATTEPKQEQFNSTYRVVSLPIQHQDWSGKEFKCSVTNKALPAPVERTITKA
KGQLRVPQVYVLAPHPDELAKNTVSVTLVKDFYPPDIYVEWQSNHPEPEGKYSTTAPQ
LNSDGSYFLYSKLSVETSRLWQGESFTCGVMHEAVENHYTQKNVSHSPGK
>IGHG6 лошади (SEQ ID NO: 34)
VIKEPCCCKPDSKFLGRPSVFI FPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVQENPDVKFNWY
VDGVEAHTATTKAKEKQDNSTYRVVSLPIQHQDWRGKEFKCKVNNRALPAPVERTITK
AKGELQDPKVIYILAPHREVTKNVSVTLVKDFYPPDIYVEWQSNHPEPEVYKYSTTAP
QLDGDGSYFLYSKLTVEVTRWQGESFTCAVMHEAIRHTYRQKSI TNPFGK
> IGHG1 макака-краббеда (SEQ ID NO: 35)
EIKTCGGGSKPPTCPAPELGGSPVFI FPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVQENPDV
VKFNWYVNGAEVHHAQTKPRETQNSTYRVVSVLTVHQDNLNGKEYTCKVSNKALPAPI
QKTIKDKGQPREPQVYTLPPSREELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIVEWESSGQPENTYK

TTPPVLDSDGSYFLYSKLTVDKSRWQQNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
 > IGHG1 макака-pezyca (SEQ ID NO: 36)
 EIKTCGGGSKPPTCPCTSPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPD
 VKFNWYVNGAEVHHAQTKPRETQYNSTYRVVSVLTVTHQDNLNGKEYTCKVSNKALPAPI
 QKTISKDKGQPREPQVYITLPPSREELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIVEWESSGQPENTYK
 TTPPVLDSDGSYFLYSKLTVDKSRWQQNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
 > IGHG2 макака-pezyca (SEQ ID NO: 37)
 GLPCRSTCPCPAELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEEPDKFNWYV
 DGVEVHNAQTKPREEQFNSTYRVVSVLTVTHQDNLNGKEYTCKVSNKALPAPKQKTVSKT
 KGQPREPQVYITLPPPKRELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIVEWASNGQPENTYKTTTPVLD
 SDGSYFLYSKLTVDKSRWQQNFTFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
 > IGHG3 макака-pezyca (SEQ ID NO: 38)
 EFTPPCGDTPPCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV
 QFNWYVDGAEVHHAQTKPREEQFNSTYRVVSVLTVTHQDNLNGKEYTCKVSNKGLPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVYITLPPQEELTKNQVSLTCLVGFYPSDIAVEWESNGQPENTYKT
 TTPVLDSDGSYFLYSKLTVDKSRWQQNFTFSCSVMEALHNHYTQKSLSVSP
 > IGHG1 свиньи (SEQ ID NO: 39)
 GIHQPTCPICPGCEVAGPSVFIFFPKPKDTLMISQTPVTCVVVDVSKEHAEVQFSWYV
 DGVEVHTAETRPKEEQFNSTYRVVSVLPIQHQDNLGKKEFKCKVNNKDLPAPIRTIISKA
 IGQSRPQVYITLPPAEELSRKSVTLTCLVIGFYPPDIHVEWKSNGQPEPEPNYRTTPPQ
 QDVGDTFFLYSKLAVDKARWDHGDKFECAMHEALHNHYTQKSIKSTQGK
 > IGHG2A свиньи (SEQ ID NO: 40)
 GTKTKPPCPICPACESPGPSVFIFFPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSQENPEVQFSWYV
 DGVEVHTAETRPKEEQFNSTYRVVSVLPIQHQDNLGKKEFKCKVNNKDLPAPIRTIISKA
 KGQTRPQVYITLPPHAELSRKSVITCLVIGFYPPDIDVEWQRNGQPEPEGNYRTTPPQ
 QDVGTYFLYSKFSVDKASWQGGGIFQCAVMHEALHNHYTQKSIKSTPGK
 > IGHG2B свиньи (SEQ ID NO: 41)
 GTKTKPPCPICPACESPGPSVFIFFPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSQENPEVQFSWYV
 DGVEVHTAETRPKEEQFNSTYRVVSVLPIQHQDNLGKKEFKCKVNNKDLPAPIRTIISKA
 KGQTRPQVYITLPPHAELSRKSVITCLVIGFYPPDIDVEWQRNGQPEPEGNYRTTPPQ
 QDVGTYFLYSKFSVDKASWQGGGIFQCAVMHEALHNHYTQKSIKSTPGK
 > IGHG3 свиньи (SEQ ID NO: 42)
 GTKTKPPCPICPACESPGPSVFIFFPKPKDTLMISQTPVTCVVVDVSKEHAEVQFSWYV
 DGVEVHTAETRPKEEQFNSTYRVVSVLPIQHQDNLGKKEFKCKVNNKDLPAPIRTIISKA
 IGQSRPQVYITLPPAEELSRKSVITCLVIGFYPPDIHVEWKSNGQPEPEGNYRTTPPQ
 QDVGDTFFLYSKLAVDKARWDHGETFECAMHEALHNHYTQKSIKSTQGK
 > IGHG4 свиньи (SEQ ID NO: 43)
 GTKTKPPCPICPACESGPGPSAFIFFPKPKDTLMISRTPKVTCVVVDVSQENPEVQFSWYV
 DGVEVHTAETRPKEEQFNSTYRVVSVLPIQHQDNLGKKEFKCKVNNKDLPAPIRTIISKA
 KGQTRPQVYITLPPPTTEELSRKSVITCLVIGFYPPDIDVEWQRNGQPEPEGNYRTTPPQ
 QDVGTYFLYSKLAVDKASWQRGDTFQCAVMHEALHNHYTQKSIKSTPGK
 > IGHG5 свиньи (SEQ ID NO: 44)
 GRPCPICPACESGPGPSAFIFFPKPKDTFMISRTPKVTCVVVDVSQENPEVQFSWYVDGVE
 VHTAETRPKEEQFNSTYRVVSVLPIQHQDNLGKKEFKCKVNNKDLPAPIRTIISKAKGQT
 REPQVYITLPPPTTEELSRKSLSVTCLITGFYPPDIDVEWQRNGQPEPEGNYRTTPPQDVD
 GTYFLYSKLAVDKASWQRGDPFQCAVMHEALHNHYTQKSIKSTPGN

Согласно определенным вариантам реализации полипептид, содержащий область CH3, представляет собой молекулу IgG и дополнительно содержит домены CH1 и CH2. Примеры последовательностей IgG человека включают константные области IgG1 (например, SEQ ID NO:1), IgG2 (например, SEQ ID NO:2), IgG3 (например, SEQ ID NO:3) и IgG4 (например, SEQ ID NO:4).

Fc-область также может входить в состав или происходить из константной области тяжелой цепи IgA (например, SEQ ID NO:5), IgD (например, SEQ ID NO:6), IgE (например, SEQ ID NO:7) и IgM (например, SEQ ID NO: 8).

Предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения включают, не ограничиваясь перечисленными, антители, биспецифическое антители, моноспецифическое моновалентное антители, биспецифическое макситело (макситело относится к scFv-Fc), монотело, пептитело, биспецифическое пептитело, моновалентное пептитело (пептид, соединенный с одним плечом гетеродимерной молекулы Fc) и гибридный белок рецептор-Fc.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная стратегия может использоваться наряду с другими стратегиями для изменения взаимодействий доменов антитела, например изменения CH3-домена для уменьшения или стимуляции способности указанного домена к взаимодействию с самим собой.

Если замены скоординированы надлежащим образом, изменения способствуют образованию дисульфидной связи между остатками контактной поверхности, которая стабилизирует формирование гетеродимера.

Согласно определенным аспектам настоящего изобретения предложен способ получения гетероди-

мерного белка. Указанный гетеродимер может содержать первый СНЗ-содержащий полипептид и второй СНЗ-содержащий полипептид, которые при объединении образуют контактную поверхность, сконструированную для стимуляции и стабилизации формирования гетеродимера. Указанные первый СНЗ-содержащий полипептид и второй СНЗ-содержащий полипептид сконструированы таким образом, что в состав контактной поверхности входят одна или большее количество аминокислот, содержащих сульфгидрильную группу, расположение которых обеспечивает образование дисульфидной связи между сульфгидрильной группой аминокислоты на первом СНЗ-содержащем гетеродимере и сульфгидрильной группой аминокислоты на втором СНЗ-содержащем гетеродимере.

Согласно определенным вариантам реализации СНЗ-содержащий полипептид содержит Fc-область IgG, предпочтительно происходящую из Fc-область IgG человека дикого типа. Под Fc IgG человека "дикого типа" понимается последовательность аминокислот, которая встречается в природе в популяции человека. Разумеется, как может незначительно варьировать последовательность Fc у разных индивидумов, также одно или несколько изменений может быть внесено в последовательность дикого типа; при этом она по-прежнему будет входить в объем настоящего изобретения. Например, Fc-область может включать дополнительные изменения, не связанные с настоящим изобретением, такие как мутация в сайте гликозилирования, включение не встречающейся в природе аминокислоты, мутации типа "выступы-во-впадины" или мутации пар заряженных остатков.

Дополнительные мутации, которые могут быть внесены в Fc IgG1, включают облегчающие образование гетеродимера между Fc-содержащими полипептидами. Согласно некоторым вариантам реализации Fc-область сконструирована так, чтобы формировались "выступы" и "впадины", облегчающие образование гетеродимера двух разных Fc-содержащих полипептидных цепей при совместной экспрессии в клетке (патент США № 7695963). Согласно другим вариантам реализации Fc-область изменяют с использованием эффекта электростатического взаимодействия для стимуляции формирования гетеродимера наряду с предотвращением образования гомодимера двух разных Fc-содержащих полипептидов при совместной экспрессии в клетке (WO 09/089004, включенная в настоящий документ посредством ссылки полностью). Предпочтительные гетеродимерные Fc включают Fc, одна цепь которых включает замены D399K и E356K, а другая цепь включает замены K409D и K392D. Согласно другим вариантам реализации одна цепь Fc включает замены D399K, E356K и E357K, а другая цепь Fc включает замены K409D, K392D и K370D.

Тяжелые цепи могут также содержать одну или большее количество мутаций, влияющих на связывание антитела, содержащего указанные тяжелые цепи, с одним или большим количеством Fc-рецепторов. Одна из функций Fc- части антитела заключается в коммуникации с иммунной системой при связывании антителом мишени. Указанную коммуникацию называют "эффекторной функцией". Коммуникация обуславливает антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ), антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ) и/или комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ). АЗКЦ и АЗКФ опосредованы связыванием Fc с Fc-рецепторами на поверхности клеток иммунной системы. КЗЦ опосредована связыванием Fc с белками системы комплемента, например C1q.

Подклассы IgG варьируют в отношении способности опосредовать эффекторные функции. Например, IgG1 значительно превосходит IgG2 и IgG4 в отношении опосредования АЗКЦ и КЗЦ. Эффекторная функция антитела может быть увеличена или уменьшена путем введения в Fc одной или нескольких мутаций. Варианты реализации настоящего изобретения включают Fc-содержащие белки, например антитела или гибридные Fc-белки, содержащие Fc, сконструированный для увеличения эффекторной функции (US № 7317091 и Strohl, Curr. Opin. Biotech., 20:685-691, 2009; оба источника включены в настоящий документ посредством ссылки полностью). Примеры молекул Fc IgG1 с повышенной эффекторной функцией включают (согласно системе нумерации Eu) следующие замены:

S239D/I332E
 S239D/A330S/I332E
 S239D/A330L/I332E
 S298A/D333A/K334A
 P247I/A339D
 P247I/A339Q
 D280H/K290S
 D280H/K290S/S298D
 D280H/K290S/S298V
 F243L/R292F/Y300L
 F243L/R292F/Y300L/P396L
 F243L/R292F/Y300L/V305I/P396L
 G236A/S239D/I332E
 K326A/E333A
 K326W/E333S
 K290E/S298G/T299A
 K290N/S298G/T299A
 K290E/S298G/T299A/K326E
 K290N/S298G/T299A/K326E
 K334V
 L235S+S239D+K334V
 Q311M+K334V
 S239D+K334V
 F243V+K334V
 E294L+K334V
 S298T+K334V
 E233L+Q311M+K334V
 L234I+Q311M+K334V
 S298T+K334V
 A330M+K334V
 A330F+K334V
 Q311M+A330M+K334V
 Q311M+A330F+K334V
 S298T+A330M+K334V
 S298T+A330F+K334V
 S239D+A330M+K334V
 S239D+S298T+K334V
 L234Y+K290Y+Y296W
 L234Y+F243V+ Y296W
 L234Y+E294L+ Y296W
 L234Y + Y296W
 K290Y + Y296W

Дополнительные варианты реализации настоящего изобретения включают Fc-содержащие белки, например антитела или гибридные Fc-белки, с Fc, сконструированным таким образом, чтобы понижать эффекторную функцию. Примеры молекул Fc с пониженной эффекторной функцией включают (при использовании системы нумерации Eu) содержащие следующие замены:

N297A или N297Q (IgG1)
 L234A/L235A (IgG1)
 V234A/G237A (IgG2)
 L235A/G237A/E318A (IgG4)
 H268Q/V309L/A330S/A331S (IgG2)
 C220S/C226S/C229S/P238S (IgG1)
 C226S/C229S/E233P/L234V/L235A (IgG1)
 L234F/L235E/P331S (IgG1)
 S267E/L328F (IgG1)

Другой способ повышения эффекторной функции содержащих Fc IgG белков заключается в уменьшении фукозилирования Fc. Удаление коровой фукозы из олигосахаридов типа биантенарных комплексов, присоединенных к Fc, значительно повышало эффекторную функцию АЗКЦ без изменения связывания антигена или эффекторной функции КЗЦ. Известен ряд способов уменьшения или предотвращения фукозилирования содержащих Fc молекул, например антител. Они включают рекомбинантную экспрессию в определенных линиях клеток млекопитающих, в том числе линии клеток, с нокаутом FUT8, варианте линии клеток CHO Lec13, линии клеток гибридомы крысы YB2/0, линии клеток, содержащей малые интерферирующие РНК, направленные конкретно против гена FUT8, и линии клеток, коэкспрессирующих β -1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III и α -маннозидазу II комплекса Гольджи. Как вариант, содержащая Fc молекула может экспрессироваться в не принадлежащей млекопитающему клетке, такой как растительная, дрожжевая или прокариотическая клетка, например *E. coli*. Соответственно согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения композиция содержит Fc, отличающийся пониженным фукозилированием или полностью нефукозилированный.

Известно, что IgG1 человека содержит участок гликозилирования в положении N297 (система нумерации EU), и гликозилирование вносит вклад в эффекторную функцию антител IgG1. Группы вводили мутации по остатку N297 с целью получения агликозилированных антител. Указанные мутации в основном относились к заменам N297 на аминокислоты, напоминающие аспарагин в физико-химическом отношении, например на глутамин (N297Q) или на аланин (N297A), который имитирует аспарагины без полярных групп.

В настоящем документе "агликозилированное антитело" или "агликозилированный Fc" относится к статусу гликозилирования остатка в положении 297 в составе Fc. Антитело или другая молекула может быть гликозилировано(а) по одному или нескольким другим положениям, но, тем не менее, будет считаться агликозилированным антителом или агликозилированным гибридным Fc-белком.

В предварительной заявке на патент США сер. № 61/784669, принадлежащей заявителю настоящей заявки, поданной 14 марта 2013 г., полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки, описан лишенный эффекторной функции Fc IgG1. Мутация аминокислоты N297 IgG1 человека с заменой на глицин, т.е. N297G, обеспечивает значительно более эффективное очищение и лучшие биофизические свойства по сравнению с заменами указанного остатка на другие аминокислоты. Соответственно согласно предпочтительным вариантам реализации антитело или гибридный Fc-белок содержит Fc IgG1 человека с заменой N297G.

Агликозилированные содержащие Fc IgG1 молекулы, как было показано, менее стабильны, чем гликозилированные содержащие Fc IgG1 молекулы. Fc-область может также быть сконструирована таким образом, чтобы повышать стабильность агликозилированной молекулы. Согласно некоторым вариантам реализации одна или большее количество аминокислот заменены на цистеин таким образом, чтобы формировались дисульфидные связи в димерном состоянии. Остатки V259, A287, R292, V302, L306, V323 или I332 области CH2 могут быть заменены на цистеин. Согласно предпочтительным вариантам реализации специфические пары остатков заменены таким образом, что они преимущественно образуют дисульфидную связь друг с другом, таким образом ограничивая или предотвращая образование перекрестных дисульфидных связей. Предпочтительные пары включают, не ограничиваясь перечисленными, A287C и L306C, V259C и L306C, R292C и V302C, V323C и I332C.

В настоящем изобретении предложены Fc-содержащие молекулы, отличающиеся тем, что один или большее количество остатков V259, A287, R292, V302, L306, V323 или I332 заменены на цистеин. Предпочтительные Fc-содержащие молекулы включают содержащие замены A287C и L306C, V259C и L306C, R292C и V302C или V323C и I332C.

Представляющий интерес полипептид может быть присоединен к N-концу или C-концу Fc-области IgG для получения гибридного Fc-белка. Согласно определенным вариантам реализации указанный гибридный Fc-белок содержит линкер между Fc и представляющим интерес полипептидом. В данной области техники известно множество различных линкерных полипептидов, которые могут использоваться в контексте гибридного Fc-белка. Согласно предпочтительным вариантам реализации гибридный Fc-белок содержит одну или большее количество копий пептида, включающего GGGGS (SEQ ID NO: 45), GGNGT (SEQ ID NO: 46) или YGNGT (SEQ ID NO: 47) между Fc и представляющим интерес пептидом или полипептидом. Согласно некоторым вариантам реализации указанная область полипептида между Fc-областью и область представляющего интерес пептида или полипептида содержит одну копию GGGGS (SEQ ID NO: 45), GGNGT (SEQ ID NO: 46) или YGNGT (SEQ ID NO: 47). Линкеры GGNGT (SEQ ID NO: 46) или YGNGT (SEQ ID NO: 47) подвергаются гликозилированию при экспрессии в подходящих клетках; такое гликозилирование может помогать стабилизации белка в растворе и/или при введении *in vivo*. Соответственно согласно определенным вариантам реализации гибридный Fc-белок содержит гликозилированный линкер между Fc-областью и областью представляющего интерес белка.

В предварительной заявке на патент США 61/591161, поданной 01.26.2012 г., принадлежащей заявителю настоящей заявки, и РСТ-заявке № РСТ/US2013/023456, поданной 01.28.2013 г. (обе заявки полностью включены в настоящий документ посредством ссылки), описаны гибридные белки GDF15-Fc. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения полипептид содержит Fc-

область антитела, из которой удалены или в которой заменены один или большее количество цистеинов шарнирной области, и одна или большее количество аминокислот контактной поверхности СНЗ заменены на содержащий остаток с сульфгидрильной группой, предпочтительно цистеин, при этом указанный полипептид не является гибридом Fc и GDF15. В частности, полипептид содержит Fc-область антитела, из которой удалены или в которой заменены один или большее количество цистеинов шарнирной области, и одна или большее количество аминокислот контактной поверхности СНЗ заменены на содержащий остаток с сульфгидрильной группой, предпочтительно цистеин, при этом указанный полипептид не является гибридным белком Fc с GDF15 согласно описанию в РСТ-заявке № РСТ/US2013/023456, например, как гибридные GDF15-белки, содержащие

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTCPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVVKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 48);

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTCPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 49);

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTCPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVVKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGARNGDHCPLGPGRCRRLHTVRSLEDLGDWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPVAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVSLSQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 50);

MEWSWVFLFSLVTTGVHSAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTCPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVVKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGARNGDHCPLGPGRCRRLHTVRSLEDLGDWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPVAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVSLSQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 51);

MEWSWVFLFSLVTTGVHSAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTCPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 52);

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVVKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 53);

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 54);

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVVKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGARNGDHCPLGPGRCRRLHTVRSLEDLGDWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPVAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVSLSQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 55);

MEWSWVFLFSLVTTGVHSAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVVKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGARNGDHCPLGPGRCRRLHTVRSLEDLGDWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPVAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVSLSQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 56); или

MEWSWVFLFSLVTTGVHSAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 57).

Полинуклеотиды, кодирующие антитела и гибридные Fc-белки.

Настоящим изобретением охвачены нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелые цепи антитела и гибридные Fc-белки. Аспекты настоящего изобретения включают варианты полинуклеотидов (например, обусловленные вырожденностью), которые кодируют описанные в настоящем документе последовательности аминокислот.

Последовательности нуклеотидов, соответствующие описанным в настоящем документе последовательностям аминокислот, для применения в качестве зондов или праймеров для выделения нуклеиновых кислот или в качестве запрашиваемых последовательностей для поиска в базах данных могут быть полу-

чены путем "обратной трансляции" последовательностей аминокислот. Хорошо известная процедура полимеразной цепной реакции (ПЦР) может быть применена для выделения и амплификации последовательности ДНК, кодирующей тяжелые цепи антитела и гибридные Fc-белки. Олигонуклеотиды, определяющие требуемые концы комбинации фрагментов ДНК, используют в качестве 5'- и 3'-праймеров. Указанные олигонуклеотиды могут дополнительно содержать сайты распознавания рестрикционными эндонуклеазами для облегчения встраивания амплифицированной комбинации фрагментов ДНК в экспрессионный вектор. Техники ПЦР описаны в источниках: Saiki et al., *Science* 239:487 (1988); *Recombinant DNA Methodology*, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego (1989), pp. 189-196 и *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et al., eds., Academic Press, Inc. (1990).

Молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению включают ДНК и РНК как в одноцепочечной, так и в двуцепочечной форме, а также соответствующие комплементарные последовательности. "Выделенная нуклеиновая кислота" представляет собой нуклеиновую кислоту, отделенную от соседних генетических последовательностей, присутствующих в геноме организма, из которого была выделена указанная нуклеиновая кислота, в случае нуклеиновых кислот, выделенных из встречающихся в природе источников. Понятно, что в тех случаях, когда нуклеиновые кислоты синтезированы ферментативным способом на матрице или химическим путем, например продукты ПЦР, молекулы кДНК или олигонуклеотиды, они представляют собой выделенные нуклеиновые кислоты. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты относится к молекуле нуклеиновой кислоты в виде отдельного фрагмента или в виде компонента конструкции нуклеиновой кислоты большего размера. Согласно одному предпочтительному варианту реализации нуклеиновые кислоты, по существу, не содержат загрязняющего эндогенного материала. Молекула нуклеиновой кислоты предпочтительно происходит из ДНК или РНК, выделенной по меньшей мере однократно, по существу, в чистом виде и в количестве или в концентрации, позволяющей проведение идентификации, манипуляций и восстановления последовательности составляющих ее нуклеотидов при помощи стандартных биохимических методов (таких как изложенные в руководстве Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Такие последовательности предпочтительно представлены и/или сконструированы в форме открытой рамки считывания, не прерываемой внутренними нетранслируемыми последовательностями, или интронами, которые, как правило, присутствуют в эукариотических генах. Последовательности нетранслируемой ДНК могут присутствовать в направлении 5' или 3' от открытой рамки считывания, где они не мешают манипуляциям с кодирующей областью или ее экспрессии.

Варианты, предложенные в настоящем изобретении, обычно получают путем сайт-специфического мутагенеза нуклеотидов в ДНК, кодирующей тяжелую цепь или гибридный Fc-белок, с применением каскадного или ПЦР-мутагенеза, или других техник, хорошо известных в данной области техники, для получения ДНК, кодирующей указанный вариант, и последующей экспрессии рекомбинантной ДНК в культуре клеток согласно описанию в настоящем документе. Однако содержащие тяжелые цепи и гибридные Fc-белки могут быть получены и путем синтеза *in vitro* с применением общепринятых техник. Указанные варианты, как правило, проявляют такую же в качественном отношении биологическую активность, что и встречающийся в природе аналог, хотя могут также выбраны варианты, обладающие модифицированными характеристиками, как будет более подробно изложено далее.

Как будет ясно специалистам в данной области техники, ввиду вырожденности генетического кода может быть получено очень большое число нуклеиновых кислот, все из которых кодируют тяжелые цепи и гибридные Fc-белки согласно настоящему изобретению. Соответственно идентифицировав конкретную последовательность аминокислот, специалисты в данной области техники смогут получить любое число различных нуклеиновых кислот путем простой модификации последовательности одного или большего количества кодонов способом, который не изменяет последовательность аминокислот кодируемого белка.

В настоящем изобретении также предложены экспрессионные системы и конструкции в форме плазмид, экспрессионных векторов, транскрипционных или экспрессионных каскадов, которые содержат по меньшей мере один полинуклеотид согласно описанию выше. Кроме того, в настоящем изобретении предложены клетки-хозяева, содержащие такие экспрессионные системы или конструкции.

Как правило, экспрессионные векторы, используемые в любых клетках-хозяевах, содержат последовательности для поддержания плазмиды и для клонирования и экспрессии экзогенных последовательностей нуклеотидов. Такие последовательности, в совокупности называемые "фланкирующими последовательностями", согласно определенным вариантам реализации, как правило, включают один или большее количество следующих последовательностей нуклеотидов: промотор, одна или большее количество энхансерных последовательностей, точка начала репликации, последовательность терминации транскрипции, полную интронную последовательность, содержащую донорный и акцепторный участки сплайсинга, последовательность, кодирующую лидерную последовательность для секреции полипептида, участок связывания рибосомы, последовательность полиаденилирования, полилинкерную область для встраивания нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, который необходимо экспрессировать, и селективируемый маркерный элемент. Каждая из указанных последовательностей описана ниже.

Вектор необязательно может включать кодирующую "метку" последовательность, т.е. молекулу

олигонуклеотида, расположенную 5'- или 3'-конце кодирующей тяжелой цепь или гибридный Fc-белок последовательности; указанная последовательность олигонуклеотида кодирует поли-His (например, гекса-His (SEQ ID NO: 58)), или другую "метку", например FLAG, HA (гемагглютинин вируса гриппа) или тус, для которых существуют коммерчески доступные антитела. Указанную метку, как правило, присоединяют к полипептиду в ходе экспрессии указанного полипептида, и она может служить для аффинной очистки или детекции белка из клетки-хозяина. Аффинную очистку можно осуществлять, например, посредством колоночной хроматографии с применением антител против метки в качестве аффинной матрицы. Необязательно, указанную метку можно впоследствии удалять из очищенной(ого) тяжелой цепи или гибридных Fc-белков различными способами, например расщеплением с помощью определенных пептидаз.

Фланкирующие последовательности могут быть гомологичными (т.е. принадлежать тому же виду и/или штамму/линии, что и клетка-хозяин), гетерологичными (т.е. принадлежать виду, отличному от вида или штамма/линии клетки-хозяина), гибридными (т.е. представлять собой комбинацию фланкирующих последовательностей более чем из одного источника), синтетическими или нативными. Таким образом, источником фланкирующей последовательности может быть любой прокариотический или эукариотический организм, любой позвоночный или беспозвоночный организм, или любое растение, при условии, что фланкирующая последовательность функциональна в клетке-хозяине и может быть активирована за счет имеющихся у клетки-хозяина механизмов.

Фланкирующие последовательности, подходящие для применения в векторах согласно настоящему изобретению, могут быть получены любыми из ряда способов, хорошо известных в данной области техники. Как правило, фланкирующие последовательности, подходящие для применения согласно настоящему изобретению, ранее были идентифицированы путем картирования и/или расщепления рестрикционными эндонуклеазами и соответственно могут быть выделены из подходящего тканевого источника с применением подходящих рестрикционных эндонуклеаз. В некоторых случаях может быть известна полная последовательность нуклеотидов фланкирующей последовательности. Для целей настоящего изобретения фланкирующая последовательность может быть синтезирована с применением описанных в настоящем документе способов синтеза или клонирования нуклеиновых кислот.

Независимо от того, известна ли вся фланкирующая последовательность или только ее часть, она может быть получена с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или путем скрининга геномной библиотеки с применением подходящего зонда, например фрагмента олигонуклеотида и/или фланкирующей последовательности из того же или другого вида. Если фланкирующая последовательность неизвестна, фрагмент ДНК, содержащий фланкирующую последовательность, может быть выделен из большего фрагмента ДНК, который может содержать, например, кодирующую последовательность или даже другой ген или гены. Выделение можно осуществлять путем расщепления рестрикционной эндонуклеазой с получением требуемого фрагмента ДНК и последующим выделением посредством очистки хроматографией в агарозном геле на колонке Qiagen® (Чатсворт, Калифорния), или с применением других способов, известных специалисту в данной области техники. Выбор подходящих ферментов для достижения указанной цели будет очевиден для специалиста в данной области техники.

Участок начала репликации, как правило, входит в состав прокариотических экспрессионных векторов из коммерческих источников; указанный участок начала репликации способствует амплификации вектора в клетке-хозяине. Если выбранный вектор не содержит сайта начала репликации, последний может быть химически синтезирован на основе известной последовательности и лигирован в вектор. Например, начало репликации из плазмиды pBR322 (New England Biolabs, Беверли, Массачусетс) подходит для большинства грамотрицательных бактерий, а различные вирусные сайты начала репликации (например, SV40, полиомавируса, аденовируса, вируса везикулярного стоматита (VBS), или папилломавирусов, таких как ВПЧ или ВПВ) подходят для клонирующих векторов в клетках млекопитающих. Обычно компонент начала репликации для экспрессионных векторов млекопитающих не требуется (например, участок начала репликации SV40 часто используется исключительно постольку, поскольку также содержит ранний вирусный промотор).

Последовательность терминации транскрипции, как правило, расположена в направлении 3' от конца кодирующей области полипептида и служит для терминации транскрипции. Обычно последовательность терминации транскрипции в прокариотических клетках представляет собой богатый G-C фрагмент, за которым следует последовательность поли-Т. Хотя указанная последовательность может легко быть клонирована из библиотеки или даже приобретена из коммерческого источника в виде части вектора, ее также можно легко синтезировать с применением способов синтеза нуклеиновых кислот, таких как описанные в настоящем документе.

Селектируемый маркерный ген кодирует белок, необходимый для выживания и роста клетки-хозяина, культивируемой на селективной культуральной среде. Типичные селективные маркерные гены кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например ампициллину, тетрациклину или канамицину для прокариотических клеток-хозяев; (б) восполняют ауксотрофную недостаточность клетки или (с) обеспечивают важнейшие питательные вещества, отсутствующие в комплексной среде или среде определенного состава. Специфические селектируемые маркеры

представлены геном устойчивости к канамицину, геном устойчивости к ампициллину и геном устойчивости к тетрациклину. Ген устойчивости к неомицину также может быть успешно использован для отбора как прокариотических, так и эукариотических клеток-хозяев.

Другие селективируемые гены могут быть использованы для амплификации гена, который будет экспрессироваться. Амплификация представляет собой процесс, при котором гены, которые требуются для получения белка, критически важного для роста или выживания клетки, тандемно повторяются в составе хромосом последовательных поколений рекомбинантных клеток. Примеры подходящих селективируемых маркеров для клеток млекопитающих включают ген дигидрофолатредуктазы (ДГФР) и беспромоторный ген тимидинкиназы. Клетки-трансформанты млекопитающих подвергаются селективному давлению, при котором только трансформанты уникальным образом адаптированы для выживания за счет селективируемого гена, присутствующего в векторе. Давление отбора реализуют путем культивирования трансформированных клеток в условиях, когда концентрация селективного агента в среде последовательно повышается, что приводит к амплификации селективируемого гена, и ДНК, которая кодирует другой ген, например тяжелую цепь антитела или гибридный Fc-белок. В результате увеличения количества полипептида, например тяжелой цепи или гибридного Fc-белка, синтезируют из амплифицированной ДНК.

Участок связывания рибосомы обычно необходим для инициации трансляции мРНК и характеризуется последовательностью Шайна-Дальгарно (прокариоты) или последовательностью Козак (эукариоты). Указанный элемент, как правило, расположен в направлении 3' от промотора и в направлении 5' от последовательности полипептида, который требуется экспрессировать. Согласно определенным вариантам реализации одна или большее количество кодирующих областей могут быть функционально связаны с внутренним сайтом связывания рибосомы (IRES), обеспечивая трансляцию двух открытых рамок считывания с одного РНК-транскрипта.

В некоторых случаях, например, если в экспрессионной системе для эукариотической клетки-хозяина требуется гликозилирование, могут быть проведены манипуляции с различными предпоследовательностями или пропоследовательностями для повышения гликозилирования или выхода. Например, можно изменить участок расщепления пептидазой конкретного сигнального пептида или добавить пропоследовательности, которые также могут влиять на гликозилирование. Конечный белковый продукт может содержать в положении -1 (относительно первой аминокислоты зрелого белка) одну или большее количество дополнительных аминокислот, связанных с экспрессией, которые не обязательно полностью удалены. Например, конечный белковый продукт может содержать один или два остатка аминокислот, обнаруживаемых в сайте расщепления пептидазой, присоединенных к аминоконцу. Как вариант, применение некоторых сайтов расщепления ферментами может приводить к получению незначительно усеченной формы требуемого полипептида, если расщепление ферментом происходит в такой области зрелого полипептида.

Экспрессионные и клонирующие векторы согласно настоящему изобретению, как правило, содержат промотор, распознаваемый организмом-хозяином и функционально связанный с молекулой, кодирующей тяжелую цепь или гибридный Fc-белок. Промоторы представляют собой нетранскрибируемые последовательности, расположенные выше (т.е. в направлении 5') относительно стартового кодона структурного гена (обычно в пределах приблизительно 100-1000 п.о.), контролирующие транскрипцию структурного гена. Промоторы обычно относят к одному из двух классов: индуцируемые промоторы и конститутивные промоторы. Индуцируемые промоторы иницируют повышение уровней транскрипции ДНК, находящейся под их контролем, в ответ на некоторые изменения условий культивирования, например присутствие или отсутствие питательного вещества или изменение температуры. Конститутивные промоторы, с другой стороны, постоянно транскрибируют ген, с которым они функционально связаны, то есть в незначительной степени контролируют или не контролируют экспрессию гена. Хорошо известно значительное число промоторов, распознаваемых различными потенциальными клетками-хозяевами.

Подходящие промоторы для применения у хозяев-дрожжей также хорошо известны в данной области техники. Целесообразно использование дрожжевых энхансеров с дрожжевыми промоторами. Подходящие промоторы для применения у клеток-хозяев млекопитающих хорошо известны и включают, не ограничиваясь перечисленными, полученные из геномов вирусов, таких как полиомавирус, вирус оспы кур, аденовирус (например, аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирусы, вирус гепатита В и предпочтительно вирус обезьян 40 (SV40). Другие подходящие промоторы млекопитающих включают гетерологичные промоторы млекопитающих, например промоторы генов теплового шока и промотор гена актина.

Дополнительные промоторы, которые могут представлять интерес, включают, не ограничиваясь перечисленными: ранний промотор SV40 (Benoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310); промотор ЦМВ (Thomsen et al., 1984, Proc. Natl. Acad. U.S.A. 81:659-663); промотор, содержащийся в длинном 3'-концевом повторе вируса саркомы Пауса (Yamamoto et al., 1980, Cell 22:787-797); промотор тимидинкиназы вируса герпеса (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1444-1445); промоторные и регуляторные последовательности гена металлотрионеина Prinster et al., 1982, Nature 296:39-42) и прокариотические промоторы, такие как бета-лактамазный промотор (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731) или промотор tac (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25).

Также представляют интерес следующие области контроля транскрипции животных, демонстрирующие тканеспецифичность и использовавшиеся у трансгенных животных: контрольная область гена эластазы I, активная в ацинарных клетках поджелудочной железы (Swift et al., 1984, Cell 38:639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); контрольная область гена инсулина, активная в бета-клетках поджелудочной железы (Hanahan, 1985, Nature 315:115-122); контрольная область гена иммуноглобулина, активная в лимфоидных клетках (Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658; Adames et al., 1985, Nature 318:533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444); контрольная область вируса опухоли молочной железы мышей, активная в клетках яичек, молочной железы, лимфоидных и тучных клетках (Leder et al., 1986, Cell 45:485-495); контрольная область гена альбумина, активная в печени (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-276); контрольная область гена альфа-фетопропротеина, активная в печени (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 253:53-58); контрольная область гена альфа-1-антитрипсина, активная в печени (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-171); контрольная область гена бета-глобина, активная в миелоидных клетках (Mogram et al., 1985, Nature 315:338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94); контрольная область гена основного белка миелина, активная в олигодендроцитах головного мозга (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712); контрольная область гена легкой цепи-2 миозина, активная в скелетных мышцах (Sani, 1985, Nature 314:283-286); и контрольная область гена гонадотропного рилизинг-гормона, активная в гипоталамусе (Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378).

В вектор может быть встроена энхансерная последовательность для усиления транскрипции у высших эукариот. Энхансеры представляют собой цис-действующие элементы ДНК, обычно имеющие длину приблизительно 10-300 п.о., воздействующие на промотор с усилением транскрипции. Энхансеры являются относительно независимыми от ориентации и расположения, поскольку обнаруживались как в направлении 5', так и в направлении 3' относительно транскрипционной единицы. Известен ряд доступных энхансерных последовательностей из генов млекопитающих (например, глобина, эластазы, альбумина, альфа-фетопропротеина и инсулина). Однако, как правило, используют вирусный энхансер. Энхансер SV40, энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы и энхансеры аденовирусов, известные в данной области техники, представляют собой примеры энхансерных элементов для активации эукариотических промоторов. Хотя энхансер может располагаться в векторе либо в направлении 5', либо в направлении 3' относительно кодирующей последовательности, он, как правило, расположен на участке в направлении 5' от промотора. Последовательность, кодирующая подходящую нативную или гетерологичную сигнальную последовательность (лидерную последовательность или сигнальный пептид), может быть встроена в экспрессионный вектор для содействия внеклеточной секреции антитела или гибридного Fc-белка. Выбор сигнального пептида или лидера зависит от типа клеток-хозяев, где будет продуцироваться белок, и гетерологичная сигнальная последовательность может замещать нативную сигнальную последовательность. Примеры сигнальных пептидов, функциональных в клетках-хозяевах млекопитающих, включают следующие: сигнальная последовательность для интерлейкина-7 (IL-7), описанная в патенте США № 4965195; сигнальная последовательность для рецептора интерлейкина-2, описанная в Cosman et al., 1984, Nature 312:768; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-4, описанный в европейском патенте № 0367566; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-1 типа I, описанный в патенте США № 4968607; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-1 типа II, описанный в европейском патенте № 0460846.

Указанный вектор может содержать один или большее количество элементов, облегчающих экспрессию при встраивании вектора в геном клетки-хозяина. Примеры включают элемент EASE (Aldrich et al. 2003 Biotechnol Prog. 19:1433-38) и область прикрепления к матриксу (MAR). Области MAR опосредуют структурную организацию хроматина и могут изолировать встроенный вектор, предохраняя его от эффекта "положения". Соответственно MAR подходят для применения, в частности, когда вектор используется для получения стабильных трансфектантов. В данной области техники известен ряд природных и синтетических содержащих MAR нуклеиновых кислот, см., например, патенты США №№ 6239328, 7326567, 6177612, 6388066, 6245974, 725901, 6037525, 7422874, 7129062.

Экспрессионные векторы согласно настоящему изобретению могут быть сконструированы из исходного вектора, например коммерчески доступного вектора. Такие векторы могут содержать или не содержать все требуемые фланкирующие последовательности. Если одна или большее количество фланкирующих последовательностей, согласно описанию в настоящем документе, изначально не присутствуют в векторе, они могут быть получены индивидуально и лигированы в вектор. Способы, применяемые для получения каждой из фланкирующих последовательностей, хорошо известны специалисту в данной области техники.

После того, как вектор сконструирован и молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая тяжелую цепь или гибридный Fc-белок, встроена в надлежащий участок вектора, готовый вектор может быть встроен в подходящую клетку-хозяина для амплификации и/или экспрессии полипептида. Трансформация экспрессионным вектором выбранной клетки-хозяина может быть осуществлена хорошо известными способами, включая трансфекцию, инфекцию, соосаждение с фосфатом кальция, электропорацию, микроинъекцию, липофекцию, опосредованную ДЭАЭ-декстраном трансфекцию или другие известные тех-

ники. Выбранный способ отчасти зависит от типа клетки-хозяина, которую предполагается использовать. Указанные способы и другие подходящие способы хорошо известны специалистам в данной области техники и представлены, например, у Sambrook et al., 2001, выше.

Клетка-хозяин при культивировании в подходящих условиях синтезирует тяжелую цепь или гибридный Fc-белок, который(ая) затем может быть собран(а) из культуральной среды (если клетка-хозяин секретирует его в среду) или получен непосредственно из продуцирующей его клетки-хозяина (если он не секретируется). Выбор подходящей клетки-хозяина зависит от различных факторов, таких как требуемые уровни экспрессии, модификации полипептида, желательные или необходимые для активности (например, гликозилирование или фосфорилирование) и простоты укладки в биологически активную молекулу. Клетка-хозяин может быть эукариотической или прокариотической.

Доступные линии клеток млекопитающих для применения в качестве хозяев для экспрессии хорошо известны в данной области техники и включают, не ограничиваясь перечисленными, иммортализованные линии клеток, доступные в Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection, ATCC); любые линии клеток, используемые в экспрессионных системах, известных в данной области техники, можно применять для получения рекомбинантных полипептидов согласно настоящему изобретению. В общих чертах, клетки-хозяева трансформируют рекомбинантным экспрессионным вектором, который содержит ДНК, кодирующую нужную тяжелую цепь или Fc-гибрид. Подходящие клетки-хозяева включают прокариотические клетки, дрожжи или клетки высших эукариот. Прокариоты включают грамотрицательные или грамположительные организмы, например *E. coli* или бациллы.

Клетки высших эукариот включают клетки насекомых и устойчивые клеточные линии, происходящие из млекопитающих. Примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих включают линию клеток COS-7 почки обезьяны (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., 1981, Cell 23:175), клетки L, клетки 293, клетки C127, клетки 3T3 (ATCC CCL 163), клетки яичника китайского хомячка (CHO) или их производные, такие как Vегgie CHO и родственные линии клеток, растущие на бессывороточной среде (Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28: 31), клетки HeLa, линии клеток ВНК (ATCC CRL 10) и линия клеток CV1/EBNA, происходящая из линии клеток CV1 почки африканской зеленой марьшской (ATCC CCL 70), описанная в McMahon et al., 1991, EMBO J. 10: 2 821, эмбриональные клетки почки человека, такие как 293, 2 93 EBNA или MSR 293, эпидермальные клетки A431 человека, клетки Colo205 человека, другие линии трансформированных клеток приматов, нормальные диплоидные клетки, линии клеток, происходящие из *in vitro* культуры первичной ткани, первичные эксплантаты, клетки HL-60, U937, HaK или Jurkat. Необязательно для экспрессии полипептида можно использовать такие клеточные линии млекопитающих, как, например, HepG2/3В, KB, NIH 3T3 или S49, если предполагается применение полипептида в анализе передачи сигналов или репортерных генов.

Как вариант, возможно получение полипептида у низших эукариот, таких как дрожжи, или у прокариот, таких как бактерии. Подходящие дрожжи включают *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, штаммы *Kluuyveromyces*, *Candida* или любой дрожжевой штамм, способный экспрессировать гетерологичные полипептиды. Подходящие бактериальные штаммы включают *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* или любой бактериальный штамм, способный экспрессировать гетерологичные полипептиды. В том случае, когда полипептид получают в дрожжах или в бактериях, может быть целесообразным модифицировать продуцируемый полипептид, например, путем фосфорилирования или гликозилирования подходящих сайтов, для получения функционального полипептида. Такие ковалентные присоединения можно проводить с применением известных химических или ферментативных способов.

Полипептид может также быть получен путем функционального связывания выделенной нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению с подходящими контрольными последовательностями в одном или нескольких экспрессионных векторах насекомых и применения экспрессионной системы для насекомых. Материалы и методы для применения экспрессионных систем на основе бакуловирусов/клеток насекомых коммерчески доступны в виде наборов, например, от Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния, США (набор MaxVac®); такие способы хорошо известны в данной области техники, согласно описанию у Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987) и Luckow and Summers, Bio/Technology 6:47 (1988). Также для получения полипептидов с применением РНК, происходящих из описанных в настоящем документе конструкций нуклеиновых кислот, можно использовать бесклеточные системы трансляции. Подходящие клонирующие и экспрессионные векторы для применения в бактериальных, грибных, дрожжевых клетках-хозяевах, а также клетках-хозяевах млекопитающих, описаны Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985). Клетка-хозяин, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению, предпочтительно функционально связанную по меньшей мере с одной последовательностью контроля экспрессии, представляет собой "рекомбинантную клетку-хозяина".

Фармацевтические композиции.

Улучшенная стабильность и пониженная агрегация, свойственные полипептидам согласно настоящему изобретению, в частности, делает их подходящими для применения в фармацевтических композициях. Такие композиции содержат один или большее число дополнительных компонентов, таких как фи-

физиологически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или разбавитель. Необязательно указанная композиция дополнительно содержит один или большее количество физиологически активных агентов, например, согласно описанию ниже. Согласно различным конкретным вариантам реализации указанная композиция содержит один, два, три, четыре, пять или шесть физиологически активных агентов помимо одного или большего количества антител и/или гибридных Fc-белков, предложенных в настоящем изобретении.

Согласно одному варианту реализации указанная фармацевтическая композиция содержит антитело и/или гибридный Fc-белок согласно настоящему изобретению наряду с одним или большим количеством веществ, выбранных из группы, состоящей из буфера, антиоксиданта, например аскорбиновой кислоты, низкомолекулярного полипептида (например, содержащего менее 10 аминокислот), белка, аминокислоты, углевода, такого как глюкоза, сахароза или декстрины, хелатирующего агента, такого как EDTA, глутатиона, стабилизатора и вспомогательного вещества.

Нейтральный забуференный солевой раствор или солевой раствор в смеси с конспецифичным сывороточным альбумином представляют собой примеры подходящих разбавителей. В соответствии с надлежащими промышленными стандартами можно также добавлять консерванты, такие как бензиловый спирт. Композиция может быть получена в виде лиофилизата с применением подходящих растворов вспомогательных веществ (например, сахарозы) в качестве разбавителей. Подходящие компоненты нетоксичны для реципиентов в применяемых дозировках и концентрациях. Дополнительные примеры компонентов, подходящих для применения в фармацевтических составах, приведены в руководстве: Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed. (1980), 20th Ed. (2000), Mack Publishing Company, Easton, PA.

Предложены наборы для применения практикующими медицинскими специалистами, включающие одно или большее количество антител и/или гибридных Fc-белков согласно настоящему изобретению, и этикетку или другие инструкции для применения при лечении любых из обсуждаемых в настоящем документе состояний. Согласно одному варианту реализации набор включает стерильный состав с одним или большим количеством антител и/или гибридных Fc-белков, который может быть представлен в виде композиции согласно описанию выше и может размещаться в одном или нескольких сосудах.

Дозировки и частота введения могут варьировать в зависимости от таких факторов, как способ введения, конкретное(ый) применяемое(ый) антитело и/или гибридный Fc-белок, природа и тяжесть подлежащего лечению заболевания, того, является ли состояние острым или хроническим, размеров и общего состояния субъекта. Подходящие дозировки могут быть определены при помощи процедур, известных в соответствующей области техники, например в ходе клинических испытаний, которые могут включать исследования с эскалацией дозы.

Антитело и/или гибридный Fc-белок согласно настоящему изобретению можно вводить, например, однократно или более чем однократно, например через регулярные интервалы на протяжении периода времени. Согласно конкретным вариантам реализации антитело и/или гибридный Fc-белок вводят по меньшей мере однократно на протяжении периода продолжительностью один месяц или более, например на протяжении одного, двух или трех месяцев, или даже в течение неопределенно долгого периода. При лечении хронических состояний обычно наиболее эффективно долгосрочное лечение. Однако при лечении острых состояний введение на протяжении менее продолжительных периодов, например от одной до шести недель, может быть достаточным. В общих чертах, антитело и/или гибридный Fc-белок вводят до проявления у пациента медицински значимой степени улучшения относительно исходного выбранного показателя или показателей.

Как известно в соответствующей области техники, фармацевтические композиции, содержащие антитело и/или гибридный Fc-белок согласно настоящему изобретению, вводят субъекту способом, подходящим при имеющихся показаниях. Фармацевтические композиции можно вводить с применением любой подходящей техники, в том числе, но не ограничиваясь перечисленным, парентерально, местно или путем ингаляции. При инъекции фармацевтическую композицию можно вводить, например, внутрисуставно, внутривенно, внутримышечно, внутрь очага поражения, внутрибрюшинно или подкожно, в виде болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Предусмотрено локальное введение, например, в участок, пораженный заболеванием или повреждением, а также трансдермальная доставка и замедленное высвобождение из имплантатов. Доставка посредством ингаляции включает, например, назальную или пероральную ингаляцию, применение небулайзера, ингаляционные антитела и/или гибридный Fc-белок в форме аэрозоля и т.п. Другие альтернативы включают составы для перорального приема, в том числе таблетки, сиропы или пастилки.

Определения.

Если в настоящем документе не указано иное, научные и технические термины, используемые в отношении настоящего изобретения, имеют значения, обычно подразумеваемые специалистами в данной области техники. Кроме того, если иное не продиктовано контекстом, термины в единственном числе включают и множественное число, а термины во множественном числе включают и единственное число. Обычно системы номенклатуры, используемые применительно к культивированию клеток и тканей, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетике и химии белков и нуклеиновых кислот и гибридизации, описанных в настоящем документе, и применительно к соответствующим техникам, хо-

рошо известны и являются общеупотребительными в соответствующей области техники. Способы и техники, предложенные в настоящем изобретении, обычно реализуют в соответствии со стандартными способами, хорошо известными в данной области техники и описанными в различных общих и более специализированных источниках, цитируемых и обсуждаемых в различных разделах настоящего описания, если не указано иное (см., например, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), и Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), которые включены в настоящий документ посредством ссылки). Ферментативные реакции и техники очищения реализуют в соответствии с инструкциями производителя, как принято в данной области техники или согласно описанию в настоящем документе. Терминология, используемая применительно к аналитической химии, синтетической органической химии и медицинской и фармацевтической химии, и соответствующие лабораторные процедуры и техники, описанные в настоящем документе, хорошо известны и являются общеупотребительными в данной области техники. Для химического синтеза, химического анализа, разработки, получения и доставки фармацевтических составов и лечения пациентов можно применять стандартные техники.

Приведенные ниже термины, если не указано иное, подразумевают следующие значения. Термин "выделенная молекула" (где молекула представляет собой, например, полипептид, полинуклеотид или антитело) представляет собой молекулу, которая в силу своего происхождения или источника происхождения (1) не связана с естественным образом ассоциированными с ней компонентами, сопровождающими ее в естественном состоянии, (2) по существу, не содержит других молекул, происходящих из того же вида, (3) экспрессируется клеткой другого вида или (4) не встречается в природе. Соответственно молекула, которая была химически синтезирована или экспрессирована в клеточной системе, отличной от клетки, из которой она естественным образом происходит, является "выделенной" в отношении естественным образом ассоциированных с ней компонентов. Молекула также может быть, по существу, освобождена от естественным образом ассоциированных с ней компонентов путем выделения с применением техник очищения, хорошо известных в данной области техники. Чистота или гомогенность молекулы может быть проанализирована с применением ряда способов, хорошо известных в данной области техники. Например, чистота образца полипептида может быть проанализирована с применением электрофореза в полиакриламидном геле и окрашивания геля для визуализации полипептида с применением техник, хорошо известных в данной области техники. Для определенных целей можно обеспечивать большее разрешение с применением ВЭЖХ или других способов очищения, хорошо известных в данной области техники.

Полинуклеотидные и полипептидные последовательности обозначают с применением стандартных однобуквенных или трехбуквенных аббревиатур. Если не указано иное, аминоконец полипептидных последовательностей находится слева, а карбоксильный конец - справа, и 5'-конец одноцепочечных последовательностей нуклеиновой кислоты и верхней цепи двуцепочечных последовательностей нуклеиновой кислоты находится слева, а 3'-конец - справа. Конкретная полипептидная или полинуклеотидная последовательность также может быть описана путем описания ее отличий от референсной последовательности.

Термины "пептид", "полипептид" и "белок" относятся к молекуле, содержащей две или большее количество остатков аминокислот, соединенных между собой пептидными связями. Указанные термины охватывают, например, нативные и искусственные белки, фрагменты белков и аналоги полипептидов (такие как мутеины, варианты белков и гибридные белки) белковой последовательности, а также посттрансляционно или иным образом ковалентно или нековалентно модифицированные белки. Пептид, полипептид или белок может быть мономерным или полимерным.

Термин "фрагмент полипептида" в настоящем документе относится к полипептиду с делецией на аминоконце и/или карбоксильном конце по сравнению с соответствующим полноразмерным белком. Длина фрагментов может составлять, например, по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 50, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350 или 400 аминокислот. Длина фрагментов может составлять также, например, максимум 1000, 750, 500, 250, 200, 175, 150, 125, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 14, 13, 12, 11 или 10 аминокислот. Фрагмент может также содержать на одном или на обоих концах одну или большее количество дополнительных аминокислот, например последовательность аминокислот из другого встречающегося в природе белка или искусственной последовательности аминокислот.

Полипептиды согласно настоящему изобретению включают полипептиды, которые были модифицированы любым способом и с любой целью, например для (1) снижения восприимчивости к протеолизу, (2) уменьшения восприимчивости к окислению, (3) изменения сродства к связыванию для образования белковых комплексов, (4) изменения сродства к связыванию и (4) придания или модификации других физико-химических или функциональных свойств. Аналоги включают мутеины полипептида. Например, одна или несколько замен аминокислот (например, консервативных замен аминокислот) могут быть введены во встречающуюся в природе последовательность (например, в часть полипептида, расположенную вне домена(ов), образующего(их) межмолекулярные контакты). "Консервативная замена аминокислоты" представляет собой замену, по существу, не изменяющую структурные характеристики ис-

ходной последовательности (например, заменяющая аминокислота не проявляет тенденции к разрушению спирали, возникающей в исходной последовательности, или разрушению других типов вторичной структуры, характерные для исходной последовательности или необходимые для ее функционирования). Примеры известных в данной области техники вторичных и третичных структур полипептидов описаны в источниках: *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W.H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)) и Thornton et al. *Nature* 354:105 (1991), все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

"Вариант" полипептида включает последовательность аминокислот, в которую были встроены, из которой были удалены и/или в которой были заменены один или большее количество остатков аминокислот относительно другой последовательности полипептидов. Варианты согласно настоящему изобретению включают содержащие варианты доменов СН₂ или СН₃. Согласно определенным вариантам реализации вариант включает одну или большее количество мутаций, присутствие которых в молекуле Fc повышает сродство полипептида к одному или большему количеству FcγRs. Такие варианты проявляют повышенную антителизависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность. Примеры обеспечивающих такой эффект вариантов описаны в патенте США № 7317091.

Другие варианты включают уменьшающие способность содержащих СН₃-доменов полипептидов к гомодимеризации, наряду с повышением способность к гетеродимеризации. Примеры таких вариантов Fc описаны в патентах США №№ 5731168 и 7183076. Дополнительные примеры описаны в предварительной заявке на патент США № 61/019569 того же заявителя, поданной 01.07.2008, и 61/120305, поданной 12.05.2008 (обе заявки включены в настоящий документ полностью посредством ссылки).

"Производное" полипептида представляет собой полипептид (например, антитело), который был химически модифицирован, например, путем сопряжения с другим химическим фрагментом, таким как, например, полиэтиленгликоль, цитотоксический агент, альбумин (например, альбумин сыворотки человека), путем фосфорилирования и гликозилирования. Если не указано иное, термин "антитело" включает, помимо антител, содержащих две полноразмерных тяжелых цепи и две полноразмерных легких цепи, их производные, варианты, фрагменты и мутеины, примеры которых описаны в настоящем документе.

Содержащий СН₃-домен полипептид может иметь, например, структуру встречающегося в природе иммуноглобулина.

"Имуноглобулин" представляет собой тетрамерную молекулу. Во встречающихся в природе иммуноглобулинах каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом каждая пара содержит одну "легкую" (приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (приблизительно 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи включает вариабельную область размером приблизительно 100-110 или более аминокислот, в первую очередь, отвечающую за распознавание антигена. Карбокси-концевая часть каждой цепи определяет константную область, в первую очередь, отвечающую за эффекторную функцию. Легкие цепи человека классифицируют как легкие цепи каппа и ламбда. Тяжелые цепи классифицируют как мю, дельта, гамма, альфа или эпсилон, и они определяют изотип антитела: IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. Вариабельные и константные области в составе легких и тяжелых цепей соединены областью "J", имеющей длину приблизительно 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь также включает область "D" длиной приблизительно 10 или более аминокислот (см. в целом: *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (включен в настоящий документ посредством ссылки полностью для любых целей). Вариабельные области каждой пары легкой/тяжелой цепи образуют участок связывания антитела, так что интактный иммуноглобулин содержит два сайта связывания.

Встречающиеся в природе цепи иммуноглобулинов демонстрируют одинаковую общую структуру, включающую относительно консервативные каркасные области (FR), соединенные тремя гипервариабельными областями, также называемыми определяющими комплементарность областями, или CDR. В направлении от N-конца к C-концу и легкие, и тяжелые цепи содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Обозначения аминокислот каждого домена соответствуют определениям Kabat et al. из руководства: *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242, 1991. Интактные антитела включают поликлональные, моноклональные, гибридные, гуманизированные или полностью принадлежащие человеку, содержащие полноразмерные тяжелые и легкие цепи.

Антитело может содержать один или большее количество сайтов связывания. При наличии более чем одного сайта связывания указанные сайты связывания могут быть идентичны друг другу или могут различаться. Например, встречающийся в природе иммуноглобулин человека, как правило, содержит два идентичных сайта связывания, тогда как "биспецифическое" или "бифункциональное" антитело содержит два разных сайта связывания.

Термин "антитело человека" включает все антитела, содержащие одну или большее количество вариабельных и константных областей, происходящих из последовательностей иммуноглобулина человека. Согласно одному варианту реализации все вариабельные и константные домены происходят из последовательностей иммуноглобулина человека (полностью принадлежащего человеку антитела). Указанные

антитела могут быть получены различными способами, примеры которых описаны ниже, в том числе путем иммунизации представляющим интерес антигеном мыши, генетически модифицированной для экспрессирования антител, происходящих из кодирующих тяжелые и/или легкие цепи человека. Один или большее количество генов, кодирующих тяжелые цепи человека, могут быть изменены таким образом, чтобы включать мутацию Ser362. Когда таких мышей иммунизируют антигеном, у мышей синтезируются антитела человека с мутацией Ser364.

Гуманизированное антитело имеет последовательность, отличающуюся от последовательности антитела, происходящего из не являющегося человеком вида, одной или большим количеством замен, делеций и/или добавлений аминокислот, таким образом, что указанное гуманизированное антитело с меньшей вероятностью индуцирует иммунный ответ и/или индуцирует менее тяжелый иммунный ответ по сравнению с антителом, происходящим из не являющегося человеком вида при введении субъекту-человеку. Согласно одному варианту реализации определенные аминокислоты в каркасных и константных доменах тяжелой и/или легкой цепей антитела, происходящего из не являющегося человеком вида, мутированы для получения гуманизированного антитела. Согласно другому варианту реализации константный(ые) домен(ы) антитела человека присоединены к варибельному(ым) домену(ам), происходящему(им) из не являющегося человеком вида. Примеры способов получения гуманизированных антител можно найти в патентах США №№ 6054297, 5886152 и 5877293.

Термин "гибридное антитело" относится к антителу, которое содержит одну или большее количество областей из одного антитела и одну или большее количество областей из одного или нескольких других антител. Согласно одному примеру гибридного антитела часть тяжелой и/или легкой цепи идентична гомологичным или происходящим из антитела конкретного вида или антитела, принадлежащего конкретному классу или подклассу, а оставшаяся часть цепи(ей) идентична, гомологична или происходит из антител(а) другого вида, или принадлежит антителу другого класса или подкласса. Также включены фрагменты таких антител, проявляющие требуемую биологическую активность.

Фрагменты или аналоги антител могут быть легко получены специалистами в данной области техники с применением принципов, изложенных в настоящем описании, и хорошо известных в данной области техники. Предпочтительные amino- и карбоксильные концы фрагментов или аналогов расположены возле границ функциональных доменов. Структурные и функциональные домены могут быть идентифицированы путем сравнения данных о последовательностях аминокислот и/или нуклеотидов с общедоступными или частными базами данных последовательностей.

Компьютеризированные способы сравнения можно применять для идентификации мотивов последовательностей или белковых доменов с предсказанной конформацией, присутствующих в других белках с известной структурой и/или функцией.

Известны способы идентификации последовательностей белков, подвергающихся укладке в известную трехмерную структуру (см., например, Bowie et al., 1991, Science 253:164).

"Антитело с привитыми CDR" представляет собой антитело, содержащее одну или большее количество областей CDR, происходящих из антитела конкретного вида или изотипа, и каркасную область другого антитела того же или другого вида или изотипа.

"Мультиспецифическое антитело" представляет собой антитело, распознающее более одного эпитопа на одном или нескольких антигенах. Подклассом антител указанного типа являются "биспецифические антитела".

"Процент идентичности" двух полинуклеотидных или двух полипептидных последовательностей определяют путем сравнения указанных последовательностей с применением компьютерной программы GAP (часть пакета GCG Wisconsin Package, версия 10.3 (Accelrys, Сан-Диего, Калифорния)) с применением параметров по умолчанию.

Термины "полинуклеотид", "олигонуклеотид" и "нуклеиновая кислота" используются в различных разделах настоящего описания взаимозаменяемо и включают молекулы ДНК (например, кДНК или геномную ДНК), молекулы РНК (например, мРНК), аналоги ДНК или РНК, полученные с применением аналогов нуклеотидов (например, пептидные нуклеиновые кислоты и не встречающиеся в природе аналоги нуклеотидов) и их гибриды. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двуцепочечной. Согласно одному варианту реализации молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению содержат непрерывную открытую рамку считывания, кодирующую антитело или Fc-гибрид, и его производное, мутеин или вариант.

Два одноцепочечных полинуклеотида "полностью комплементарны" друг другу, если их последовательности могут быть выровнены в антипараллельной ориентации таким образом, что каждый нуклеотид в одном полинуклеотиде располагается напротив комплементарного нуклеотида в другом полинуклеотиде без введения пропусков и без неспаренных нуклеотидов на 5'-конце или 3'-конце какой-либо из последовательностей. Полинуклеотид "комплементарен" другому полинуклеотиду, если указанные два полинуклеотида способны гибридизоваться друг с другом в умеренно жестких условиях. Соответственно полинуклеотид может быть комплементарен другому полинуклеотиду, не являясь полностью комплементарным ему.

"Вектор" представляет собой нуклеиновую кислоту, которую можно применять для введения дру-

гой нуклеиновой кислоты, связанной с ней, в клетку. Один тип векторов представлен "плазмидой", которая представляет собой линейную или кольцевую молекулу двуцепочечной ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты нуклеиновой кислоты. Другой тип вектора представлен вирусным вектором (например, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), отличающимся тем, что дополнительные сегменты ДНК можно вводить в вирусный геном. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую их вводят (например, бактериальные векторы, содержащие бактериальную точку начала репликации и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) встраиваются в геном клетки-хозяина при введении в указанную клетку-хозяина и таким образом реплицируются вместе с геномом хозяина. "Экспрессионный вектор" представляет собой тип вектора, способный направлять экспрессию выбранного полинуклеотида.

Последовательность нуклеотидов "функционально связана" с регуляторной последовательностью, если указанная регуляторная последовательность влияет на экспрессию (например, уровень, временные характеристики или локализацию экспрессии) указанной последовательности нуклеотидов. "Регуляторная последовательность" представляет собой нуклеиновую кислоту, которая влияет на экспрессию (например, уровень, временные характеристики или локализацию экспрессии) нуклеиновой кислоты, с которой она функционально связана. Регуляторная последовательность может, например, оказывать эффекты непосредственно на регулируемую нуклеиновую кислоту или действовать через одну или большее количество других молекул (например, полипептидов, которые связываются с регуляторной последовательностью и/или нуклеиновой кислотой). Примеры регуляторных последовательностей включают промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии (например, сигналы полиаденилирования). Дополнительные примеры регуляторных последовательностей описаны, например, Goeddel, 1990, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA и Baron et al., 1995, *Nucleic Acids Res.* 23:3605-06.

"Клетка-хозяин" представляет собой клетку, которая может быть использована для экспрессии нуклеиновой кислоты, например нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению. Клетка-хозяин может представлять собой прокариота, например *E. coli*, или может представлять собой эукариота, например одноклеточного эукариота (например, дрожжи или другой гриб), растительную клетку (например, растительную клетку табака или томата), клетку животного (например, клетку человека, клетку обезьяны, клетку хомяка, клетку крысы, клетку мыши или клетку насекомого) или гибридому. Примеры клеток-хозяев включают линии клеток яичника китайского хомячка (CHO) или их производные, в том числе линию CHO DXB-11, дефицитную по ДГФР (см. Urlaub et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-20), линии клеток CHO, растущие на бессывороточной среде (см. Rasmussen et al., 1998, *Cytotechnology* 28:31), клетки CS-9, клетки, производные от CHO DXB-11 и клетки AM-1/D (описанные в патенте США № 6210924). Другие линии клеток CHO включают CHO-K1 (ATCC# CCL-61), EM9 (ATCC# CRL-1861) и UV20 (ATCC# CRL-1862). Примеры других клеток-хозяев включают линию COS-7 клеток почки обезьяны (ATCC CRL 1651) (см. Gluzman et al., 1981, *Cell* 23:175), клетки L, клетки C 127, клетки 3T3 (ATCC CCL 163), клетки HeLa, линии клеток ВНК (ATCC CRL 10), линию клеток CV1/EBNA, происходящую из линии клеток почки африканской зеленой мартышки CV1 (ATCC CCL 70) (см. McMahon et al., 1991, *EMBO J.* 10:2821), эмбриональные клетки почки человека, такие как 293, 293 EBNA или MSR 293, эпидермальные клетки человека A431, клетки человека Colo205, другие линии трансформированных клеток приматов, нормальные диплоидные клетки, линии клеток, происходящие из *in vitro* культуры первичной ткани, первичные эксплантаты, клетки HL-60, U937, HaK или Jurkat. Как правило, клетка-хозяин представляет собой культивируемую клетку, которая может быть трансформирована или трансфицирована кодирующей полипептид нуклеиновой кислотой, которая затем может экспрессироваться в клетке-хозяине.

Выражение "рекомбинантная клетка-хозяин" может быть применено для обозначения клетки-хозяина, которая была трансформирована или трансфицирована нуклеиновой кислотой, которую необходимо экспрессировать. Клетка-хозяин также может представлять собой клетку, которая содержит нуклеиновую кислоту, но не экспрессирует ее на требуемом уровне, если в указанную клетку-хозяина не введена регуляторная последовательность таким образом, чтобы обеспечить ее функциональную связь с нуклеиновой кислотой. Следует понимать, что термин клетка-хозяин относится не только к конкретной клетке-субъекту, но и к потомству или потенциальному потомству такой клетки. Поскольку в последующих поколениях могут происходить определенные модификации в результате, например, мутации или воздействия окружающей среды, такое потомство фактически может не быть идентичным исходной клетке, но, тем не менее, входит в объем термина согласно настоящему документу.

Примеры

Следующие примеры, в том числе проведенные эксперименты и полученные результаты, представлены исключительно в иллюстративных целях и не должны быть истолкованы как ограничивающие настоящее изобретение.

Пример 1. Получение конструкций с цистеиновым зажимом.

Гибридные пептиды, содержащие последовательности Fc с парами заряженных остатков с цистеи-

новым зажимом (шарнирная область удалена), стабильно экспрессировали в адаптированной к росту в суспензии в бессывороточной среде линии клеток CHO-K1. Fc-гибридные молекулы клонировали в стабильный экспрессионный вектор, содержащий ген устойчивости к пурамицину, а цепи Fc клонировали в гигромицинсодержащий экспрессионный вектор (Selexis, Inc.). Плазмиды трансфицировали в пропорции 1:1 с применением липофектамина LTX; клетки отбирали через 2 дня после трансфекции на ростовой среде, содержащей 10 мкг/мл пурамицина и 600 мкг/мл гигромицина. В ходе отбора среду заменяли 2 раза в неделю. Когда жизнеспособность клеток достигала приблизительно 90%, клетки размножали для масштабного производства в подпитываемой культуре. Клетки высевали с плотностью 1е6/мл в продукционную среду и подпитывали на 3, 6 и 8 день. Кондиционированную среду (CM), продуцированную клетками, собирали на 10 день и осветляли. Конечные показатели жизнеспособности, как правило, составляли более 90%.

Fc-гибриды осветляли, кондиционированную среду (CM) очищали с применением двухэтапной хроматографической процедуры. Приблизительно 5 л CM вводили прямо в колонку GE MabSelect SuRe, заранее уравновешенную забуференным фосфатом солевым раствором (ФСБ) Дульбекко. Связанный белок проводили через три этапа отмывки: сначала в 3-х объемах колонки (CV) ФСБ; затем в 1 CV 20 mM Tris, 100 mM хлорида натрия, pH 7,4; и наконец, в 3 CV 500 mM L-аргинина, pH 7,5. Указанные этапы отмывки устраняли несвязанные или слабосвязанные компоненты среды и загрязняющие примеси из клеток-хозяев. Затем колонку повторно уравновешивали 5 CV 20 mM Tris, 100 mM хлорида натрия при pH 7,4 что возвращает УФ-поглощение к базовому уровню. Нужный белок элюировали 100 mM уксусной кислотой при pH 3,6 и собирали в массу. Объединенный белок быстро титровали до значений pH в диапазоне от 5,0 до 5,5, используя 1 M Tris-HCl, pH 9,2.

Затем объединенный белок со скорректированным pH загружали на колонку с сульфопропилсефарозой GE SP Sepharose HP, предварительно уравновешенную 20 mM MES при pH 6,0. Затем связанный белок промывали 5 CV уравновешивающего буфера и наконец элюировали 20 CV в 0-50% линейном градиенте концентраций от 0 до 400 mM хлорида натрия в 20 mM MES при pH 6,0. При элюировании собирали фракции и анализировали посредством аналитической эксклюзионной хроматографии (Superdex 200) для определения подходящих фракций для объединения с получением гомогенного продукта. Высокоэффективная хроматография с сульфопропилсефарозой (SP) устраняет связанные с продуктом загрязняющие примеси, такие как свободный Fc, усеченные молекулы и мультимеры Fc и GDF15.

Затем в полученных высокоэффективной SP-хроматографией объединенных фракциях буфер заменяли на рецептурный буфер путем диализа, концентрировали приблизительно до 15 мг/мл с применением центрифуги с отсечением по молекулярной массе 10 кДа Sartorius Vivaspin 20 и, в заключение, стерилизовали фильтрацией. Полученный раствор, содержащий очищенные Fc-гибридные молекулы, помещали на хранение при 5°C. Идентичность и чистоту полученных продуктов оценивали с применением масс-спектрального анализа, электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия и эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Пример 2. Анализ конструкций с цистеиновым зажимом.

Образование дисульфидной связи.

Гибридные Fc-белки без шарнирной области, содержащие мутацию L351C, экспрессировали и очищали согласно описанию выше.

Образцы анализировали с применением ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле. Конструкции с разной молекулярной массой обладают разной подвижностью в ДСН-ПААГ. Это облегчает идентификацию связанных цепей. На фиг. 3 последняя дорожка соответствует восстанавливающим условиям, при которых дисульфидные связи распадаются, а другие дорожки соответствуют невосстанавливающим условиям для различных фракций в процессе очищения. Дисульфиды остаются интактными в невосстанавливающих условиях. Выше расположенная полоса, наблюдаемая в невосстанавливающих условиях, демонстрирует, что введенная ковалентная связь за счет дисульфидных связей между двумя цепями Fc на СНЗ-домене действительно формируется. Последняя дорожка на фиг. 3 демонстрирует, что в восстанавливающих условиях сконструированные дисульфиды распадаются, как и ожидалось, обуславливая возникновение двойных полос.

Анализ фармакокинетики.

Проводили сравнение шести гибридных конструкций Fc-белков, не содержащих шарнирной области (A-F).

A - Fc-гибрид без шарнира и без линкера между терапевтическим пептидом и Fc.

B - то же, что и A, за исключением вариации в терапевтическом пептиде.

C - то же, что и B, за исключением того, что Fc соединен с терапевтическим пептидом негликозилированным линкером.

D - то же, что и C, за исключением другого линкера.

E - то же, что и A, за исключением того, что одна цепь Fc включает замену Y349C, а другая включает замену S354C.

F - то же, что и B, за исключением того, что одна цепь Fc включает замену Y349C, а другая включает замену S354C.

Экспериментальные вещества вводили внутривенно через хвостовую вену самцам мышей с индуцированным диетой ожирением CD-1 (n=3 на каждое экспериментальное вещество) в дозе 1 мг/кг. Собирали серийные образцы крови (50 мкл на каждый момент времени) каждого животного в следующие моменты времени: 1, 4, 8, 24, 72, 168, 240 и 336 ч после дозирования. Концентрации экспериментального вещества в образцах сыворотки количественно определяли с применением сэндвич-анализа ELISA, где используются антитела против экспериментальных веществ для захвата и детекции. Нижний предел количественного определения для анализа составлял 313 мкг/л. Строили графики для профилей концентрация-время и выполняли анализ без компарментализации для вычисления показателей ФК с применением ПО Watson.

Как видно на фиг. 4, из 6 протестированных вариантов варианты с цистеиновым зажимом, E и F, имели минимальный общий системный клиренс и соответственно максимальную экспозицию (выражаемую как площадь под кривой концентрация-время, AUC). E продемонстрировал более чем 3-кратное увеличение AUC по сравнению с вариантом без цистеинового зажима A, а F продемонстрировал в 1,6-кратное улучшение AUC по сравнению с B. Соответственно фармакокинетика гибридных Fc-белков, в которых отсутствует шарнирная область, значительно улучшается при введении дисульфидной связи в контактную поверхность СНЗ.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, содержащий димер Fc-области антитела, где указанная Fc-область включает делецию или замену одного или более остатков цистеина в шарнирной области и замену одной или более аминокислот контактной поверхности СНЗ на содержащий сульфгидрильную группу остаток, где указанный полипептид имеет замену содержащего сульфгидрильную группу остатка в остатке Т394 и/или остатке Y407.

2. Полипептид по п.1, отличающийся тем, что в указанной Fc-области отсутствует содержащая цистеин часть шарнирной области.

3. Полипептид по п.2, отличающийся тем, что в указанной Fc-области отсутствует шарнирная область.

4. Полипептид по п.1, отличающийся тем, что все цистеины в шарнирной области заменены на другую аминокислоту.

5. Полипептид по п.1, отличающийся тем, что Т394 заменена на цистеин (Т394С).

6. Полипептид по п.1, отличающийся тем, что Y407 заменена на цистеин (Y407С).

7. Полипептид по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что указанная Fc-область содержит область СН2, включающую одну или более замен аминокислот.

8. Полипептид по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что указанная область СНЗ дополнительно включает одну или более дополнительных замен аминокислот.

9. Полипептид по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что одна или более аминокислот на С-конце указанной Fc-области удалены.

10. Полипептид по п.9, отличающийся тем, что удалены три, две или одна аминокислота на С-конце указанной Fc-области.

11. Полипептид по п.10, отличающийся тем, что удалена концевая аминокислота на С-конце указанной Fc-области.

12. Полипептид по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит тяжелую цепь антитела.

13. Полипептид по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит гибридный Fc-белок.

14. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по любому из пп.1-13.

15. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.14, функционально связанную с промотором.

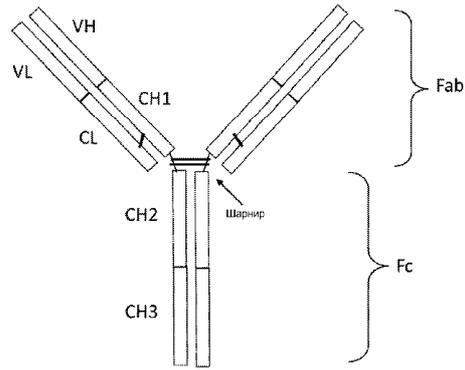
16. Клетка-хозяин, содержащая экспрессионный вектор по п.15.

17. Способ получения полипептида, включающий:

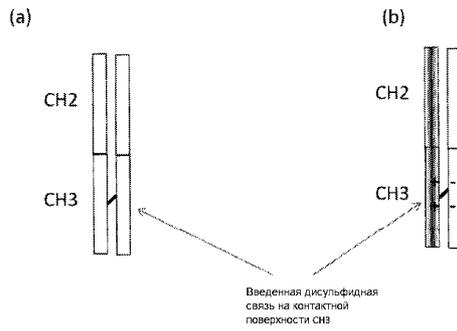
а) культивирование клетки-хозяина по п.16 в условиях, при которых указанный промотор активен в указанной клетке-хозяине и

б) выделение указанного полипептида из культуры.

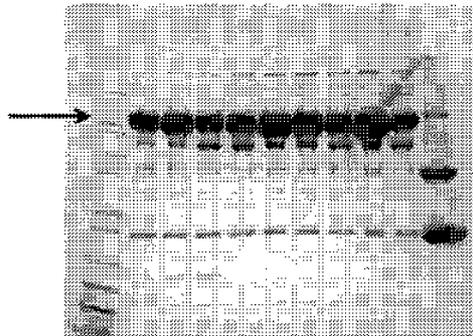
18. Фармацевтическая композиция, обладающая улучшенной стабилизацией образования димеров, содержащая полипептид по любому из пп.1-13.



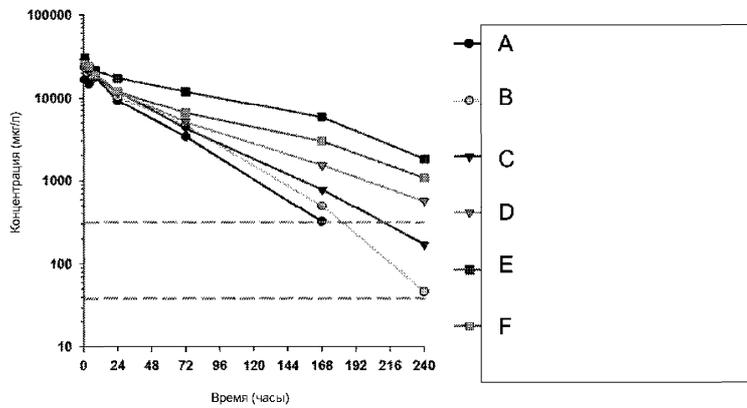
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4