

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **036292**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.10.22**

**(21)** Номер заявки  
**201691991**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2015.04.01**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 16/22** (2006.01)  
**C07K 16/24** (2006.01)

---

**(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИТЕЛА,  
ЭКСПРЕССИОННЫЙ ВЕКТОР И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ,  
СОДЕРЖАЩАЯ ЭТО АНТИТЕЛО**

---

**(31)** 14163165.5; 14179034.5

**(32)** 2014.04.02; 2014.07.30

**(33)** EP

**(43)** 2017.04.28

**(86)** PCT/EP2015/057165

**(87)** WO 2015/150447 2015.10.08

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**Ф. ХОФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (CH)**

**(72)** Изобретатель:  
**Шефер Вольфганг (DE), Клайн  
Кристиан (CH), Имхоф-Юнг Забине,  
Клостерманн Штефан, Мольхой  
Михаэль, Регула Йёрг Томас (DE)**

**(74)** Представитель:  
**Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,  
Веселицкий М.Б., Белоусов Ю.В.,  
Каксис Р.А., Куликов А.В., Кузнецова  
Е.В., Соколов Р.А., Кузнецова Т.В.  
(RU)**

**(56)** CHRISTIAN KLEIN ET AL.: "Progress in overcoming the chain association issue in bispecific heterodimeric IgG antibodies", MABS, vol. 4, no. 6, 1 November 2012 (2012-11-01), pages 653-663, XP055106060, ISSN: 1942-0862, DOI: 10.4161/mabs.21379, The whole document, in particular Table 2, Figure 1, and section "Enforcing light chain association"

SEBASTIAN FENN ET AL.: "Crystal Structure of an Anti-Ang2 CrossFab Demonstrates Complete Structural and Functional Integrity of the Variable Domain", PLOS ONE, vol. 8, no. 4, 1 April 2013 (2013-04-01), page e61953, XP055106055, ISSN: 1932-6203, DOI:10.1371/journal.pone.0061953, The whole document, in particular Fig. 1

WO-A1-2013174873

WO-A1-2013150043

WO-A1-2014081955

---

**(57)** В изобретении описаны способ получения мультиспецифического антитела, экспрессионный вектор, содержащий молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотные последовательности легких и тяжелых цепей этого антитела, и фармацевтическая композиция, содержащая это антитело.

---

**B1**

**036292**

**036292**

**B1**

Настоящее изобретение относится к способу получения мультиспецифического антитела.

### **Предпосылки создания изобретения**

В данной области известны сконструированные белки, такие как би- или мультиспецифические антитела, которые могут связываться с двумя или большим количеством антигенов. Указанные мультиспецифические связывающие белки можно создавать с использованием методов клеточного слияния, химической конъюгации или рекомбинантной ДНК.

В последние годы создано широкое разнообразие форматов рекомбинантных мультиспецифических антител, например четырехвалентные биспецифические антитела, полученные путем слияния, например, антитела IgG-формата и одноцепочечных доменов (см., например, Coloma M.J. et al., *Nature Biotech* 15, 1997, p. 159-163; WO 01/077342 и Morrison S.L., *Nature Biotech* 25, 2007, p. 1233-1234).

Разработано также несколько других новых форматов, в которых уже не сохранялась основная структура антитела (IgA, IgD, IgE, IgG или IgM), таких как димерные (диабоды), тримерные (триабоды) или тетрамерные (тетрабоды) антитела, мини-антитела, несколько одноцепочечных форматов (scFv, бис-scFv), которые могут связываться с двумя или большим количеством антигенов (Holliger P. et al., *Nature Biotech* 23, 2005, p. 1126-1136; Fischer N., Leger O., *Pathobiology*, 74, 2007, p. 3-14; Shen J et al., *Journal of Immunological Methods* 318, 2007, p. 65-74; Wu C. et al., *Nature Biotech* 25, 2007, p. 1290-1297).

Во всех указанных форматах используют линкеры либо для слияния основной структуры антитела (IgA, IgD, IgE, IgG или IgM) с дополнительным связывающим белком (например, scFv), либо для слияния, например, двух Fab-фрагментов или scFv (Fischer N., Leger O., *Pathobiology*, 74, 2007, p. 3-14). Хотя очевидно, что линкеры дают преимущества при создании биспецифических антител, с ними могут быть связаны также проблемы терапевтического плана. Фактически эти чужеродные пептиды могут вызывать иммунный ответ против самого линкера или области стыка между белком и линкером. Кроме того, гибкая природа этих пептидов делает их более чувствительными к протеолитическому расщеплению, что может приводить к неудовлетворительной стабильности, агрегации и повышенной иммуногенности антитела. Кроме того, может существовать необходимость в поддержании эффекторных функций, таких, например, как комплементзависимая цитотоксичность (CDC) или антитело-обусловленная клеточно-зависимая цитотоксичность (ADCC), которые опосредуются Fc-областью, путем сохранения высокой степени сходства с встречающимися в естественных условиях антителами.

Таким образом, в идеальном варианте необходимо создавать биспецифические антитела, структура которых очень сходна с общей структурой встречающихся в естественных условиях антител (типа IgA, IgD, IgE, IgG или IgM) и имеет минимальное отклонение от человеческих последовательностей.

В соответствии с одним из подходов биспецифические антитела с высокой степенью сходства со встречающимися в естественных условиях антителами создавали с помощью технологии квадром (квадрогридом) (см. Milstein C. и Cuello A.C., *Nature*, 305, 1983, p. 537-540) на основе соматического слияния двух различных клеточных линий гибридом, которые экспрессируют мышинные моноклональные антитела с требуемыми для биспецифического антитела специфичностями. В результате случайного спаривания тяжелых и легких цепей двух различных антител в образующейся линии клеток гибрида-гибридомы (или квадромы) получают вплоть до 10 различных видов антител, из которых только одно представляет собой требуемое функциональное биспецифическое антитело. Из-за присутствия полученных в результате ошибочного спаривания побочных продуктов и в значительной степени сниженного выхода продукта требуются более сложные процедуры очистки (см., например, Morrison S.L., *Nature Biotech* 25, 2007, p. 1233-1234). В целом, эта же проблема, связанная с ошибочно спаренными побочными продуктами, сохраняется и при применении методов рекомбинантной экспрессии.

Подход, с помощью которого можно обойти проблему, связанную с полученными в результате ошибочных спариваний побочными продуктами, известный под названием технология "knobs-into-holes" (взаимодействие по типу "выступ-впадина"), направлен на усиление спаривания тяжелых цепей двух различных антител путем интродукции мутаций в СНЗ-домены для модификации поверхности раздела в области контакта. На одной цепи имеющие большие размеры аминокислоты заменяли на аминокислоты с короткими боковыми цепями для создания "впадины". И, наоборот, аминокислоты с более крупными боковыми цепями интродуцировали в другой СНЗ-домен, создавая "выступ". Путем совместной экспрессии этих двух тяжелых цепей (и двух идентичных легких цепей, которые должны соответствовать обеим тяжелым цепям) достигали высоких выходов гетеродимерной конструкции ("выступ-впадина") относительно гомодимерной конструкции ("впадина-впадина" или "выступ-выступ") (Ridgway J. B. et al., *Protein Eng.* 9, 1996, p. 617-621; и WO 1996/027011). Процентное содержание гетеродимера можно дополнительно повышать путем ремоделирования поверхностей раздела двух СНЗ-доменов с помощью технологии фагового дисплея и интродукции дисульфидного мостика с целью стабилизации гетеродимеров (Merchant A.M. et al., *Nature Biotech* 16, 1998, p. 677-681; Atwell S., Ridgway J.B., Wells J.A., Carter P., *J. Mol. Biol.* 270, 1997, p. 26-35). Новые подходы к технологии "knobs-into-holes" описаны, например, в EP 1870459 A1. Хотя указанный формат, по-видимому, является очень привлекательным, в настоящее время отсутствуют данные о его усовершенствовании в направлении клинического применения. Одним из важных ограничений этой стратегии является то, что легкие цепи двух родительских антител должны быть идентичными для предупреждения ошибочного спаривания и формирования неактивных молекул.

Таким образом, эта технология не пригодна в качестве основы для более легкого создания рекомбинантных три- или тетраспецифических антител к трем или четырем антигенам с использованием в качестве исходных двух антител к первому и второму антигену, поскольку сначала должны быть оптимизированы или тяжелые цепи этих антител, и/или идентичные легкие цепи, а затем добавлены дополнительные антигенсвязывающие пептиды против третьего и четвертого антигена.

В WO 2006/093794 описаны композиции гетеродимерных связывающих белков. В WO 99/37791 описаны многоцелевые производные антител. У Morrison et al., J. Immunol, 160, 1998, p. 2802-2808 описано влияние замены варьируемых областей на функциональные свойства IgG.

В WO 2013/02362 описаны гетеродимеризованные полипептиды. В WO 2013/12733 описаны полипептиды, которые содержат гетеродимерные Fc-области. В WO 2012/131555 описаны сконструированные гетеродимерные иммуноглобулины. В EP 2647707 описаны сконструированные гетеродимерные иммуноглобулины.

В WO 2013/026835 описаны биспецифические не содержащие Fc-области антитела с кроссовером доменов. В WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254 и у Schaefer W. et al., PNAS, 108, 2011, p. 11187-1191 описаны биспецифические антитела IgG-типа с кроссовером доменов.

Установлено, что для мультиспецифических антител с заменой/обменом VH/VL в одной связывающей области для предупреждения ошибочного спаривания легких цепей (CrossMab<sup>VH-VL</sup>), которые описаны в WO 2009/080252 (см. также Schaefer W. et al., PNAS, 108, 2011, p. 11187-1191), характерно выраженное снижение содержания побочных продуктов, полученных в результате ошибочного спаривания легких цепей антитела к первому антигену с "неправильной" тяжелой цепью антитела ко второму антигену (по сравнению с подходами, в которых не использовали указанный обмен доменов). Однако их получение не полностью исключает образование побочных продуктов. Основным побочным продуктом является результатом взаимодействия бенс-джонсовского типа - см. также Schaefer W. et al., PNAS, 108, 2011, p. 11187-1191; на фиг. S11 дополнения).

Таким образом, все еще существует потребность в дополнительном снижении указанных побочных продуктов с целью повышения, например, выхода указанных биспецифических антител.

#### **Краткое изложение сущности изобретения**

Изобретение относится к способу получения мультиспецифического антитела, заключающемуся в том, что осуществляют стадии, на которых:

А) трансформируют клетку-хозяина векторами, которые содержат молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела, которое специфически связывается с первым антигеном; и

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном, в котором варьируемые домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг на друга; и

в котором:

I) в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)) и в котором в константном домене CH1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота); или

II) в константном домене CL второй легкой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)) и в котором в константном домене CH1 второй тяжелой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота);

Б) культивируют клетку-хозяина в условиях, обеспечивающих синтез указанной молекулы антитела; и

В) выделяют указанную молекулу антитела из указанной культуры.

Другим вариантом осуществления изобретения является способ, в котором у указанной молекулы антитела в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K) или аргинин (R) (нумерация согласно Кэботу) и в котором в константном домене CH1 первой тяжелой цепи, указанной в (а), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Другим вариантом осуществления изобретения является способ, в котором у указанной молекулы антитела в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) и в котором в константном домене CH1 первой тяжелой цепи, указанной в (а), аминокислота в поло-

жении 147 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Другим вариантом осуществления изобретения является способ, в котором у указанной молекулы антитела в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте независимо на лизин (K) или аргинин (R)), и дополнительно аминокислота в положении 123 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) и в котором в константном домене CH1 первой тяжелой цепи, указанной в (а), аминокислота в положении 147 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) и аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Другим вариантом осуществления изобретения является способ, в котором у указанной молекулы антитела в константном домене CL второй легкой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте независимо на лизин (K) или аргинин (R)) и в котором в константном домене CH1 второй тяжелой цепи, указанной в б), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Другим вариантом осуществления изобретения является способ, в котором в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена на лизин (K) (нумерация согласно Кэботу), и дополнительно аминокислота в положении 123 заменена на лизин (K) (нумерация согласно Кэботу) и в котором в константном домене CH1 первой тяжелой цепи, указанной в (а), аминокислота в положении 147 заменена на глутаминовую кислоту (E) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота), и аминокислота в положении 213 заменена на глутаминовую кислоту (E) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Другим вариантом осуществления изобретения является способ, отличающийся тем, что первый CH3 домен первой тяжелой цепи антитела, указанной в (а), и второй CH3 домен второй тяжелой цепи антитела, указанной в (б), каждый соприкасается друг с другом на поверхности раздела, которая включает исходную поверхность раздела между CH3 доменами антитела, где указанная поверхность раздела изменена для стимулирования формирования мультиспецифического антитела, где изменение отличается тем, что:

I) CH3-домен одной тяжелой цепи изменен так, что на исходной поверхности раздела CH3-домена одной тяжелой цепи, которая соприкасается с исходной поверхностью раздела CH3-домена другой тяжелой цепи в мультиспецифическом антителе, аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, который имеет большую по объему боковую цепь, с образованием в результате этого выпуклости на поверхности раздела CH3-домена одной тяжелой цепи, которая может помещаться в полость в поверхности раздела CH3-домена другой тяжелой цепи, и

II) CH3-домен другой тяжелой цепи изменен так, что на исходной поверхности раздела CH3-домена другой тяжелой цепи, которая соприкасается с исходной поверхностью раздела CH3-домена одной тяжелой цепи в мультиспецифическом антителе, аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, который имеет меньшую по объему боковую цепь, с образованием в результате этого полости в поверхности раздела CH3-домена другой тяжелой цепи, в которую может помещаться выпуклость на поверхности раздела CH3-домена одной тяжелой цепи.

Другим вариантом осуществления изобретения является способ, отличающийся тем, что указанный аминокислотный остаток, имеющий большую по объему боковую цепь, выбран из группы, включающей аргинин (R), фенилаланин (F), тирозин (Y) и триптофан (W); и указанный аминокислотный остаток, имеющий меньшую по объему боковую цепь, выбран из группы, состоящей из аланина (A), серина (S), треонина (T) и валина (V).

Другим вариантом осуществления изобретения является способ, отличающийся тем, что оба CH3-домена дополнительно изменены путем интродукции цистеина (C) в качестве аминокислоты в соответствующие положения каждого CH3-домена таким образом, чтобы мог образоваться дисульфидный мостик между обоими CH3-доменами.

Следующим объектом данного изобретения является экспрессионный вектор, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотные последовательности легких и тяжелых цепей мультиспецифического антитела.

Следующим объектом изобретения является фармацевтическая композиция, которая содержит антитело, полученное с помощью предложенного способа, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

### Описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг. 1 - некоторые примеры мультиспецифических антител, предлагаемых в изобретении, с обменом VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфическими мутациями в одной поверхности раздела CH1/CL-доменов:

по меньшей мере аминокислота в положении 124 CL-домена заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) и

по меньшей мере аминокислота в положении 147 CH1-домена или аминокислота в положении 213 CH1-домена заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота);

на фиг. 1A - обмен VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфические мутации в поверхности раздела CH1/CL-доменов в другом связывающем плече антитела;

на фиг. 1B - обмен VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфические мутации в поверхности раздела CH1/CL-доменов в этом же связывающем плече антитела;

на фиг. 1B - обмен VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфические мутации в поверхности раздела CH1/CL-доменов в другом связывающем плече антитела и модификации поверхности раздела CH3/CH3-доменов для усиления гетеродимеризации тяжелых цепей (например, с применением технологии типа "knobs-into-holes" или в альтернативном варианте технологий гетеродимеризации типа, например замены заряженных аминокислот на соответствующие аминокислоты с противоположным зарядом);

на фиг. 2A - пример мультиспецифического антитела с обменом VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и без специфических мутаций ни в одной из поверхностей раздела CH1/CL-доменов (слева) и основного побочного продукта указанного мультиспецифического антитела (образовавшегося в результате взаимодействия бенс-джонсовского типа доменов VL-VL) - других возможных вариантов в качестве побочных продуктов не выявлено ни непосредственно с помощью масс-спектрометрии, ни с помощью масс-спектрометрии после расщепления плазмином или LysC путем анализа их Fab-фрагментов;

на фиг. 2B - отличительная структура основного побочного продукта мультиспецифического антитела с заменой VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и без специфических мутаций ни в одной из поверхностей раздела CH1/CL-доменов (образовавшегося в результате взаимодействия бенс-джонсовского типа доменов VL-VL);

на фиг. 3A - аминокислотные последовательности дикого типа (wt) CH1-домена (приведены два изоформа IgG), в которых подчеркнуты и выделены аминокислотные положения 147 и 213 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота);

на фиг. 3B - аминокислотные последовательности дикого типа (wt) CL-домена каппа-изоформа, в которых подчеркнуты и выделены аминокислотные положения 124 и 123 (нумерация согласно Кэботу);

на фиг. 3B - аминокислотные последовательности дикого типа (wt) CL-домена лямбда-изоформа, в которых подчеркнуты и выделены аминокислотные положения 124 и 123 (нумерация согласно Кэботу);

на фиг. 4A - данные о снижении содержания основного побочного продукта, образовавшегося в результате взаимодействия бенс-джонсовского типа, с помощью единичных замен заряженных аминокислот, предлагаемых в изобретении, в поверхности раздела CH1/CL.

Примеры мультиспецифических антител к Ang2-VEGF, предлагаемых в изобретении, с заменой/обменом VH/VL-доменов (CrossMAb<sup>VH-VL</sup>).

Сравнение дикого типа (wt) и различных комбинаций единичных замен заряженных аминокислот;

1) мультиспецифическое антитело дикого типа (wt) к Ang2-VEGF типа CrossMAb<sup>VH-VL</sup> без специфических аминокислотных замен в поверхности раздела CH1/CL,

2) мультиспецифические антитела к Ang2-VEGF, предлагаемые в изобретении, I) с заменами в положении 124 CL-домена и в положении 147 CH1-домена (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) или II) с заменами в положении 124 CL-домена и в положении 213 CH1-домена (нумерация согласно EU-индексу Кэбота),

3) другие мультиспецифические антитела к Ang2-VEGF типа CrossMAb<sup>VH-VL</sup> с заменами в различных положениях;

на фиг. 4B - последовательности (SEQ ID NO:) мультиспецифических антител, результаты для которых представлены на фиг. 4A;

На фиг. 5A - данные о снижении содержания основного побочного продукта, образовавшегося в результате взаимодействия бенс-джонсовского типа, с помощью различных замен заряженных аминокислот, предлагаемых в изобретении, в поверхности раздела CH1/CL.

Примеры мультиспецифических антител к Ang2-VEGF, предлагаемых в изобретении, с заменой/обменом VH/VL-доменов (CrossMAb<sup>VH-VL</sup>).

Сравнение дикого типа (wt) и различных комбинаций замен заряженных аминокислот:

на фиг. 5B - последовательности (SEQ ID NO:) мультиспецифических антител, результаты для которых представлены на фиг. 5A;

на фиг. 6А - данные о снижении содержания основного побочного продукта, образовавшегося в результате взаимодействия бенс-джонсовского типа, с помощью различных замен заряженных аминокислот в поверхности раздела СН1/СL.

Примеры мультиспецифических антител к IL-17/TWEAK, предлагаемых в изобретении, с заменой/обменом VH/VL-доменов (CrossMAb<sup>VH-VL</sup>).

Сравнение дикого типа (wt) и различных комбинаций замен заряженных аминокислот;

на фиг. 6Б - последовательности (SEQ ID NO:) мультиспецифических антител, результаты для которых представлены на фиг. 6А;

на фиг. 7 - некоторые примеры двухвалентных мультиспецифических антител, предлагаемых в изобретении, с обменом VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфическими мутациями в одной поверхности раздела СН1/СL-доменов, в приведенных в качестве примера мультиспецифических антителах отсутствует Fc-фрагмент (формат Fab-CrossFab<sup>VH-VL</sup> и CrossFab<sup>VH-VL</sup>-Fab):

по меньшей мере одна аминокислота в положении 124 СL-домена заменена независимо на лизин (К), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) и

по меньшей мере аминокислота в положении 147 СН1-домена или аминокислота в положении 213 СН1-домена заменена независимо на глутаминовую кислоту (Е) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота);

на фиг. 7А - обмен VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфические мутации в поверхности раздела СН1/СL-доменов в другом связывающем плече антитела;

на фиг. 7Б - обмен VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфические мутации в поверхности раздела СН1/СL-доменов в этом же связывающем плече антитела;

на фиг. 7В - обмен VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфические мутации в поверхности раздела СН1/СL-доменов в этом же связывающем плече антитела; и дополнительные специфические мутации в поверхности раздела СН1/СL-доменов в другом связывающем плече антитела;

на фиг. 7Г - обмен VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфические мутации в поверхности раздела СН1/СL-доменов в другом связывающем плече антитела;

на фиг. 8 - некоторые примеры трехвалентных мультиспецифических антител, предлагаемых в изобретении, с обменом VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфическими мутациями в одной поверхности раздела СН1/СL-доменов, в приведенных в качестве примера мультиспецифических антителах отсутствует Fc-фрагмент (формат Fab-Fab-CrossFab<sup>VH-VL</sup>):

по меньшей мере аминокислота в положении 124 СL-домена заменена независимо на лизин (К), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) и

по меньшей мере аминокислота в положении 147 СН1-домена или аминокислота в положении 213 СН1-домена заменена независимо на глутаминовую кислоту (Е) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота);

на фиг. 8А-8В - обмен VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфические мутации в поверхности раздела СН1/СL-доменов в других связывающих плечах антитела;

на фиг. 8Г - обмен VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфические мутации в поверхности раздела СН1/СL-доменов в этом же связывающем плече антитела;

на фиг. 8Д - обмен VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфические мутации в поверхности раздела СН1/СL-доменов в этом же связывающем плече антитела; и дополнительные специфические мутации в поверхности раздела СН1/СL-доменов в других связывающих плечах антитела;

на фиг. 9 - некоторые примеры четырехвалентных мультиспецифических антител, предлагаемых в изобретении, с обменом VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфическими мутациями в одной поверхности раздела СН1/СL-доменов, в приведенных в качестве примера мультиспецифических антителах отсутствует Fc-фрагмент (формат (Fab-Fab-CrossFab<sup>VH-VL</sup>):

по меньшей мере аминокислота в положении 124 СL-домена заменена независимо на лизин (К), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) и

по меньшей мере аминокислота в положении 147 СН1-домена или аминокислота в положении 213 СН1-домена заменена независимо на глутаминовую кислоту (Е) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота);

на фиг. 9А - обмен VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфические мутации в поверхности раздела СН1/СL-доменов в других связывающих плечах антитела;

на фиг. 9Б - обмен VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфические мутации в поверхности раздела СН1/СL-доменов в этом же связывающем плече антитела.

### Подробное описание изобретения

Мультиспецифические антитела с обменом/заменой доменов в одном связывающем плече (Cross-Mab<sup>VH-VL</sup>) подробно описаны в WO 2009/080252 и у Schaefer W. et al., PNAS, 108, 2011, p. 11187-11191 (которые включены в настоящее описание в качестве ссылки). Для них четко установлено снижение содержания побочных продуктов, полученных в результате ошибочного спаривания легких цепей антитела к первому антигену с "неправильной" тяжелой цепью антитела ко второму антигену (по сравнению с подходами, в которых не использовали указанный обмен доменов). Однако их получение не полностью исключает образование побочных продуктов. Основным побочным продуктом является результатом взаимодействия бенс-дженсовского типа - см. также Schaefer W. et al., PNAS, 108, 2011, p. 11187-11191; на фиг. S11 дополнения).

Таким образом, при создании изобретения разработан новый способ для дополнительного снижения содержания указанных побочных продуктов для повышения выхода указанных мультиспецифических антител (т.е. мультиспецифических антител, которые содержат обмен/замену VH/VL-доменов только в связывающем (их) плече(ах) одной антигенной специфичности, в то время как связывающее(ие) плечо(и) другой антигенной специфичности не содержат обмен/замену VH/VL-доменов, но обычно имеют соответствующее дикому типу строение доменов, указанное на фиг. 1, в результате интродукции замен заряженных аминокислот на аминокислоты с противоположным зарядом в специфические аминокислотные положения в CH1- и CL-доменах.

Таким образом, изобретение относится к способу получения мультиспецифического антитела, которое содержит:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела, которое специфически связывается с первым антигеном; и

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном, и в котором переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг на друга; и

в котором:

I) в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 (нумерация согласно Кэботу) заменена на положительно заряженную аминокислоту и в котором в константном домене CH1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) заменена на отрицательно заряженную аминокислоту; или

II) в константном домене CL второй легкой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 124 (нумерация согласно Кэботу) заменена на положительно заряженную аминокислоту и в котором в константном домене CH1 второй тяжелой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) заменена на отрицательно заряженную аминокислоту.

Согласно концепции изобретения способ получения антитела, предлагаемый в изобретении, включает только одну из модификаций антитела, указанных в подпунктах I) и II) выше и ниже. Таким образом, способ получения мультиспецифического антитела, предлагаемый в изобретении, позволяет получить антитело, у которого либо

I) в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), замену аминокислоты в положении 124 (нумерация согласно Кэботу) на положительно заряженную аминокислоту и в константном домене CH1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), замену аминокислоты в положении 147 или аминокислоты в положении 213 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) на отрицательно заряженную аминокислоту; либо

II) в константном домене CL второй легкой цепи, указанной в подпункте б), замену аминокислоты в положении 124 (нумерация согласно Кэботу) на положительно заряженную аминокислоту и в константном домене CH1 второй тяжелой цепи, указанной в подпункте б), замену аминокислоты в положении 147 или аминокислоты в положении 213 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) на отрицательно заряженную аминокислоту, при условии, что мультиспецифическое антитело не содержит обе модификации, указанные в подпунктах I) и II).

Таким образом, изобретение относится к способу получения мультиспецифического антитела, содержащего:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела, которое специфически связывается с первым антигеном; и

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном и в котором переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг на друга; и

в котором:

I) в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или арги-

нин (R)) и в котором в константном домене СН1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота); или

II) в константном домене CL второй легкой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)) и в котором в константном домене СН1 второй тяжелой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Кроме того, предложенным способом возможно получение мультиспецифического антитела, содержащего:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела, которое специфически связывается с первым антигеном; и

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном и в котором переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг на друга; и

в котором:

I) в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 (нумерация согласно Кэботу) заменена на положительно заряженную аминокислоту и в котором в константном домене СН1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) заменена на отрицательно заряженную аминокислоту.

В альтернативном варианте осуществления изобретения относится к способу получения мультиспецифического антитела, содержащего:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела, которое специфически связывается с первым антигеном; и

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном, и в котором переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг на друга; и

в котором:

I) в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)) и в котором в константном домене СН1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Таким образом, указанное второе антитело, специфически связывающееся со вторым антигеном, которое входит в состав мультиспецифического антитела, получаемого предложенным способом, удовлетворяет следующим условиям:

в легкой цепи переменный домен легкой цепи VL заменен на переменный домен тяжелой цепи VH указанного антитела, и

в тяжелой цепи переменный домен тяжелой цепи VH заменен на переменный домен легкой цепи VL указанного антитела, и

константные домены CL и СН1 во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела не заменены друг на друга (остаются не обменными).

A антитело, специфически связывающееся с первым антигеном, которое входит в состав мультиспецифического антитела, получаемого описанным способом, удовлетворяет следующим условиям:

в указанной первой легкой цепи, происходящей из указанного первого антитела, последовательное расположение доменов легкой цепи (CL-VL) остается неизменным и

в указанной первой тяжелой цепи, происходящей из указанного первого антитела, последовательное расположение доменов тяжелой цепи (например, СН1-VH или СН3-СН2-СН1-VH) остается неизменным (таким образом, указанное антитело, которое специфически связывается с первым антигеном, не включает обмен доменов, прежде всего обмен VH/VL).

Другими словами, указанное антитело, специфически связывающееся с первым антигеном, которое входит в состав мультиспецифического антитела, может содержать:

первую легкую цепь, происходящую из указанного первого антитела, которая содержит последовательное расположение доменов легкой цепи VL-CL (в направлении от N-конца к C-концу); и

первую тяжелую цепь, происходящую из указанного первого антитела, которая содержит последовательное расположение доменов тяжелой цепи СН1-VH (в направлении от N-конца к C-концу) (а также первая тяжелая цепь может содержать последовательное расположение доменов тяжелой цепи СН3-СН2-СН1-VH в направлении от N-конца к C-концу).

В контексте настоящего описания "легкая цепь антитела" означает полипептид, содержащий в направлении от N-конца к C-концу переменный домен легкой цепи (VL) и константный домен легкой цепи (CL) антитела, сокращенно VL-CL.

В контексте настоящего описания "тяжелая цепь антитела" означает полипептид, содержащий в направлении от N-конца к C-концу переменный домен тяжелой цепи (VH) антитела и константный домен 1 тяжелой цепи (CH1) антитела.

Мультиспецифическое антитело, тяжелая цепь может также включать в направлении от N-конца к C-концу переменный домен тяжелой цепи (VH) антитела и константный домен 1 тяжелой цепи (CH1) антитела и в нем отсутствуют константные домены CH2 и CH3, поэтому его сокращенно обозначают как VH-CH1. Кроме того, мультиспецифическое антитело, может содержать по меньшей мере два Fab-фрагмента, при этом первый Fab-фрагмент содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт, специфический для первого антигена, а второй Fab-фрагмент содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт, специфический для второго антигена, в котором во втором Fab-фрагменте переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи заменены друг на друга; и у мультиспецифического антитела отсутствует Fc-домен; и в котором:

I) в константном домене CL легкой цепи первого Fab-фрагмента аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) или независимо на лизин (K) или аргинин (R) и в котором в константном домене CH1 тяжелой цепи первого Fab-фрагмента аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота); или

II) в константном домене CL легкой цепи второго Fab-фрагмента аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)) и в котором в константном домене CH1 тяжелой цепи второго Fab-фрагмента аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Мультиспецифическое антитело может также содержать по меньшей мере два Fab-фрагмента, при этом первый Fab-фрагмент содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий центр, специфический для первого антигена, а второй Fab-фрагмент содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий центр, специфический для второго антигена, в котором во втором Fab-фрагменте переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи заменены друг на друга; и где у мультиспецифического антитела отсутствует Fc-домен; и в котором:

I) в константном домене CL легкой цепи первого Fab-фрагмента аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) или независимо на лизин (K) или аргинин (R) и в котором в константном домене CH1 тяжелой цепи первого Fab-фрагмента аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 может быть заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В контексте настоящего описания понятие "Fab-фрагмент" относится к фрагменту антитела, который содержит фрагмент легкой цепи, содержащий переменный VL-домен и константный домен легкой цепи (CL), и переменный VH-домен и первый константный домен тяжелой цепи (CH1). Кроме того, мультиспецифические антитела могут содержать по меньшей мере два Fab-фрагмента, при этом переменные области тяжелой и легкой цепей второго Fab-фрагмента обменены. Из-за обмена переменных областей указанный второй Fab-фрагмент обозначают также как "Кросс-Fab-фрагмент" или "хFab-фрагмент" или "КроссВер-Fab-фрагмент". В указанном втором Fab-фрагменте, в котором переменные области тяжелой и легкой цепей Fab обменены, молекула кроссовер-Fab содержит модифицированную тяжелую цепь, состоящую из переменной области легкой цепи (VL) и константной области тяжелой цепи (CH1), и модифицированную легкую цепь, состоящую из переменной области тяжелой цепи (VH) и константной области легкой цепи (CL). Указанную молекулу кроссовер-Fab обозначают также как CrossFab<sup>VH/VL</sup>.

В контексте настоящего описания понятие "Fc-домен" применяют для определения C-концевой области тяжелой цепи антитела, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Например, во встречающихся в естественных условиях антителах Fc-домен состоит из двух идентичных белковых фрагментов, происходящих из второго и третьего константных доменов двух тяжелых цепей антитела изоформ IgG, IgA и IgD; Fc-домены IgM и IgE содержат три константных домена тяжелой цепи (CH-домены 2-4) в каждой полипептидной цепи. В контексте настоящего описания "отсутствует Fc-домен" означает, что биспецифические антитела могут не содержать CH2-, CH3- и CH4-домены; т.е. константная тяжелая цепь состоит только из одного или нескольких CH1-доменов.

Первый и второй Fab-фрагменты соединены через пептидный линкер. В контексте настоящего описания "пептидный линкер" обозначает пептид с аминокислотными последовательностями, которые предпочтительно имеют синтетическое происхождение. Пептидный линкер можно применять для соединения

одного из Fab-фрагментов с С- или N-концом другого Fab-фрагмента для получения мультиспецифического антитела. Причем указанный пептидный линкер может представлять собой пептид с аминокислотной последовательностью, состоящей по меньшей мере из 5 аминокислот или из 5-100, еще в одном варианте осуществления изобретения из 10-50 аминокислот. Указанный пептидный линкер может представлять собой  $(G_xS)_n$  или  $(G_xS)_nG_m$ , где G обозначает глицин, S обозначает серин и  $x=3, 4, 5$  или 6 и  $m=0, 1, 2$  или 3, или  $x=4, n=2, 3, 4$  или 5 и  $m=0, 1, 2$  или 3, или  $x=4$  и  $n=2$  или 3, или  $x=4$  и  $n=2$ . Указанный пептидный линкер представляет собой  $(G_4S)_2$ . Пептидный линкер применяют для соединения первого и второго Fab-фрагментов. Первый Fab-фрагмент можно соединить с С- или N-концом второго Fab-фрагмента.

Тяжелая цепь антитела может содержать в направлении от N-конца к С-концу переменный домен тяжелой цепи (VH) антитела, константный домен 1 тяжелой цепи (CH1) антитела, константный домен 2 тяжелой цепи (CH2) и константный домен 3 тяжелой цепи (CH3), сокращенно VH-CH1-CH2-CH3.

В случае мультиспецифического антитела, которое содержит домены VH-CH1-CH2-CH3 в каждой тяжелой цепи, дополнительно можно повышать соотношение между требуемым мультиспецифическим антителом и нежелательными побочными продуктами путем модификаций первого и второго CH3-доменов указанного мультиспецифического антитела для усиления гетеродимеризации обеих тяжелых цепей, содержащих указанные первые и второй CH3-домены.

Известно несколько подходов для CH3-модификаций, направленных на усиление гетеродимеризации, которые описаны, например, в WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291. Как правило, при осуществлении всех указанных подходов первый CH3-домен и второй CH3-домен, оба, конструируют комплементарным образом так, чтобы каждый CH3-домен (или содержащая его тяжелая цепь) не обладал большей способностью к самодимеризации, но обладал усиленной способностью к гетеродимеризации с комплементарным сконструированным другим CH3-доменом (в результате чего происходит гетеродимеризация первого и второго CH3-доменов и не образуются гомодимеры между двумя первыми или двумя вторыми CH3-доменами). Указанные различные подходы повышения гетеродимеризации тяжелых цепей рассматриваются в качестве различных альтернатив в комбинации с модификациями тяжелых-легких цепей (обмен/замена VH и VL в одном связывающем плече и интродукция замен заряженных аминокислот на аминокислоты с противоположными зарядами в поверхность раздела CH1/CL) в мультиспецифических антителах, которые снижают ошибочное спаривание легких цепей и содержание побочных продуктов, образовавшихся в результате взаимодействия бенс-джонсовского типа.

Мультиспецифическое антитело, которое содержит CH3-домены в тяжелых цепях, указанные CH3-можно изменять для поддержания гетеродимеризации путем

замены по меньшей мере одной аминокислоты CH3-домена первой тяжелой цепи и

замены по меньшей мере одной аминокислоты CH3-домена второй тяжелой цепи, где указанная аминокислота контактирует по меньшей мере с одной аминокислотой CH3-домена первой тяжелой цепи в третичной структуре мультиспецифического антитела,

при этом соответствующие аминокислоты в CH3-доменах первой и второй тяжелой цепей соответственно

либо заменяют таким образом, что аминокислоты с противоположными зарядами боковых цепей интродуцируют в противоположные тяжелые цепи,

либо заменяют таким образом, что аминокислоты с большими или малыми объемами боковых цепей интродуцируют в противоположные тяжелые цепи, создавая тем самым выпуклость с помощью аминокислоты с большим объемом боковой цепи в одном CH3-домене, которая может помещаться в полость, образованную в другом CH3-домене, при этом полость создают с помощью аминокислоты с малым объемом боковой цепи.

Мультиспецифическое антитело, содержащее CH3-домены в тяжелых цепях мультиспецифического антитела, можно изменять с помощью технологии "knob-into-hole", которая подробно описана на некоторых примерах, например, в WO 96/027011, у Ridgway J.B. et al., Protein Eng. 9, 1996, p. 617-621 и у Merchant A.M. et al., Nat Biotechnol. 16, 1998, p. 677-681 и в WO 98/050431. При использовании этого метода взаимодействующие поверхности двух CH3-доменов изменяют с целью повышения уровня гетеродимеризации обеих тяжелых цепей, содержащих эти два CH3-домена. Каждый из двух CH3-доменов (двух тяжелых цепей) может представлять собой "выступ", а другой представлять собой "впадину". Введение дисульфидного мостика дополнительно стабилизирует гетеродимеры (Merchant A.M., et al., Nature Biotech. 16, 1998, p. 677-681; Atwell S. et al., J. Mol. Biol. 270, 1997, p. 26-35) и повышает выход продукта.

Таким образом, мультиспецифическое антитело, которое содержит CH3-домен в каждой тяжелой цепи и дополнительно отличается тем, что первый CH3-домен первой тяжелой цепи антитела, указанной в подпункте а), и второй CH3-домен в одной тяжелой цепи антитела, указанной в подпункте б), каждый соприкасается друг с другом на поверхности раздела, которая представляет собой исходную поверхность раздела между CH3-доменами антитела, при этом указанная поверхность раздела изменена для стимулирования формирования мультиспецифического антитела, где изменение отличается тем, что:

I) СНЗ-домен одной тяжелой цепи изменен так, что на исходной поверхности раздела СНЗ-домена одной тяжелой цепи, которая соприкасается с исходной поверхностью раздела СНЗ-домена другой тяжелой цепи в мультиспецифическом антителе, аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, который имеет большую по объему боковую цепь, с образованием в результате этого выпуклости на поверхности раздела СНЗ-домена одной тяжелой цепи, которая может помещаться в полость в поверхности раздела СНЗ-домена другой тяжелой цепи; и

II) СНЗ-домен другой тяжелой цепи изменен так, что на исходной поверхности раздела СНЗ-домена другой тяжелой цепи, которая соприкасается с исходной поверхностью раздела СНЗ-домена одной тяжелой цепи в мультиспецифическом антителе, аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, который имеет меньшую по объему боковую цепь, с образованием в результате этого полости в поверхности раздела СНЗ-домена другой тяжелой цепи, в которую может помещаться выпуклость на поверхности раздела СНЗ-домена одной тяжелой цепи.

Мультиспецифическое антитело, аминокислотный остаток которого имеет большую по объему боковую цепь, выбирают из группы, включающей аргинин (R), фенилаланин (F), тирозин (Y) и триптофан (W).

Аминокислотный остаток мультиспецифического антитела должен иметь меньшую по объему боковую цепь, выбирают из группы, включающей аланин (A), серин (S), треонин (T) и валин (V).

Оба СНЗ-домена дополнительно можно изменять путем интродукции цистеина (C) в качестве аминокислоты в соответствующие положения каждого СНЗ-домена таким образом, чтобы мог образоваться дисульфидный мостик между обоими СНЗ-доменами. Таким образом, СНЗ-домен одной тяжелой цепи дополнительно можно изменять так, чтобы в исходной поверхности раздела СНЗ-домена одной тяжелой цепи, которая соприкасается с исходной поверхностью раздела СНЗ-домена другой тяжелой цепи в мультиспецифическом антителе, аминокислотный остаток был заменен на остаток цистеина (C), а СНЗ-домен другой тяжелой цепи дополнительно изменяют так, чтобы в исходной поверхности раздела СНЗ-домена другой тяжелой цепи, которая соприкасается с исходной поверхностью раздела СНЗ-домена одной тяжелой цепи в мультиспецифическом антителе, аминокислотный остаток был заменен на остаток цистеина (C) таким образом, чтобы в результате интродукции остатков цистеина мог образоваться дисульфидный мостик между обоими СНЗ-доменами.

Мультиспецифическое антитело может содержать аминокислотную мутацию T366W в СНЗ-доме, имеющим "выступ" цепи, и аминокислотные мутации T366S, L368A, Y407V в СНЗ-доме, имеющим "впадину" цепи. Можно применять также дополнительный связывающий цепи дисульфидный мостик между СНЗ-доменами (Merchant A.M. et al., Nature Biotech. 16, 1998, p. 677-681), например, путем интродукции аминокислотной мутации Y349C в СНЗ-домен, имеющий "впадину" цепи, и аминокислотной мутации E356C или аминокислотной мутации S354C в СНЗ-доме, имеющим "выступы" цепи.

Мультиспецифическое антитело (которое содержит СНЗ-домен в каждой тяжелой цепи) также может содержать аминокислотные мутации S354C и T366W в одном СНЗ-доме и аминокислотные мутации Y349C, T366S, L368A и Y407V в другом из двух СНЗ-домов (с дополнительной аминокислотной мутацией S354C в одном СНЗ-доме и дополнительной аминокислотной мутацией Y349C в другом СНЗ-доме, что приводит к образованию дисульфидного мостика между цепями) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

СНЗ-модификации, предназначенные для усиления гетеродимеризации описаны, например, в WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954 и WO 2013/096291.

Подход к гетеродимеризации, описанный в EP 1870459A1, также можно использовать. Этот подход базируется на интродукции замен/мутаций заряженных аминокислот на аминокислоты с противоположным зарядом в конкретные аминокислотные положения в поверхности раздела СНЗ/СНЗ-домов между двумя тяжелыми цепями. В мультиспецифических антителах могут присутствовать аминокислотные мутации R409D и K370E в СНЗ-доме одной тяжелой цепи и аминокислотные мутации D399K и E357K в СНЗ-доме другой тяжелой цепи (нумерации согласно EU-индексу Кэботу).

Мультиспецифическое антитело может содержать аминокислотную мутацию T366W в СНЗ-доме "цепи с выступами" и аминокислотные мутации T366S, L368A, Y407V в СНЗ-доме "цепи с впадиной" и дополнительно содержать аминокислотные мутации R409D и K370E в СНЗ-доме "цепи с выступами" и аминокислотные мутации D399K и E357K в СНЗ-доме "цепи с впадиной".

Мультиспецифическое антитело также может содержать аминокислотные мутации S354C и T366W в СНЗ-доме одной тяжелой цепи и аминокислотные мутации Y349C, T366S, L368A и Y407V в СНЗ-доме другой тяжелой цепи или указанное мультиспецифическое антитело может содержать мутации Y349C и T366W в СНЗ-доме одной тяжелой цепи и аминокислотные мутации S354C, T366S, L368A и Y407V в СНЗ-доме другой тяжелой цепи и дополнительно содержит аминокислотные мутации R409D и K370E в СНЗ-доме цепи с "выступами" и аминокислотные мутации D399K и E357K в СНЗ-доме цепи с "впадиной".

Кроме того, можно использовать подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2013/157953. СН3-домен одной тяжелой цепи может содержать аминокислотную мутацию Т366К, а СН3-домен другой тяжелой цепи содержит аминокислотную мутацию L351D. СН3-домен одной тяжелой цепи может содержать дополнительную аминокислотную мутацию L351К, а СН3-домен второй тяжелой цепи может содержать дополнительную аминокислотную мутацию, выбранную из Y349E, Y349D и L368E.

Также можно использовать подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2012/058768. СН3-домен одной тяжелой цепи может содержать аминокислотные мутации L351Y и Y407A, а СН3-домен другой тяжелой цепи может содержать аминокислотные мутации Т366А и К409F. СН3-домен другой тяжелой цепи может содержать дополнительную аминокислотную мутацию в положении Т411, D399, S400, F405, N390 или К392. Указанную аминокислотную мутацию можно выбрать из группы, состоящей из:

- а) Т411N, Т411R, Т411Q, Т411K, Т411D, Т411E и Т411W,
- б) D399R, D399W, D399Y и D399K,
- в) S400E, S400D, S400R и S400K,
- г) F405I, F405M, F405T, F405S, F405V и F405W,
- д) N390R, N390K и N390D,
- е) K392V, K392M, K392R, K392L, K392F и K392E.

СН3-домен одной тяжелой цепи может содержать аминокислотные мутации L351Y и Y407A, а СН3-домен другой тяжелой цепи содержит аминокислотные мутации Т366V и К409F. СН3-домен одной тяжелой цепи может содержать аминокислотную мутацию Y407A, а СН3-домен другой тяжелой цепи содержит аминокислотные мутации Т366А и К409F. СН3-домен другой тяжелой цепи может дополнительно содержать аминокислотные мутации К392E, Т411E, D399R и S400R.

Также можно использовать подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2011/143545, или аминокислотную модификацию, описанную в WO 2011/143545, можно интродуцировать в СН3-домен тяжелой цепи в положение, выбранное из группы, состоящей из 368 и 409.

Кроме того, можно использовать также подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2011/090762, в котором применяют описанную выше технологию "knob-into-hole". При этом СН3-домен одной тяжелой цепи может содержать аминокислотную мутацию Т366W, а СН3-домен другой тяжелой цепи может содержать аминокислотную мутацию Y407A. СН3-домен одной тяжелой цепи может содержать аминокислотную мутацию Т366Y, а СН3-домен другой тяжелой цепи может содержать аминокислотную мутацию Y407T.

Мультиспецифическое антитело может иметь IgG2-изотип, и в качестве альтернативы можно использовать подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2010/129304.

Также можно использовать подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2009/089004. СН3-домен одной тяжелой цепи может содержать аминокислотную замену К392 или N392 на отрицательно заряженную аминокислоту (глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D), в другом случае мутацию К392D или N392D), а СН3-домен другой тяжелой цепи может содержать аминокислотную замену D399, E356, D356 или E357 на положительно заряженную аминокислоту (лизин (K) или аргинин (R), в другом случае замену D399K, E356K, D356K или E357K, а также мутацию D399K или E356K). СН3-домен одной тяжелой цепи может содержать также аминокислотную замену К409 или R409 на отрицательно заряженную аминокислоту (глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D), в другом случае мутацию К409D или R409D). СН3-домен одной тяжелой цепи в дополнительном или альтернативном варианте может содержать аминокислотную замену К439 и/или К370 на отрицательно заряженную аминокислоту (глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D)).

Можно также использовать подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2007/147901, СН3-домен одной тяжелой цепи может содержать аминокислотные мутации К253E, D282K и К322D, а СН3-домен другой тяжелой цепи содержит аминокислотные мутации D239K, E240K и К292D.

Кроме того, можно использовать подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2007/110205.

В контексте настоящего описания понятия "сайт связывания" или "антигенсвязывающий центр" обозначают область(и) молекулы антитела, с которой(ыми) фактически связывается лиганд (например, антиген или фрагмент антигена) и который происходит из антитела. Антигенсвязывающий центр включает вариабельные домены тяжелой цепи антитела (VH) и/или вариабельный домен легкой цепи антитела (VL) или пары VH/VL.

Антигенсвязывающие центры, обладающие способностью специфически связываться с требуемым антигеном, можно получать из а) известных антител к антигену или б) новых антител или фрагментов антител, полученных de novo с помощью методов иммунизации с использованием, среди прочего, либо антигенного белка, либо нуклеиновой кислоты или их фрагментов или с помощью метода фагового дисплея.

Антигенсвязывающий центр антитела может содержать шесть гипервариабельных участков (CDR), которые вносят различный вклад в аффинность сайта связывания с антигеном. Они представляют собой три вариабельных домена (CDR-участки) тяжелой цепи (CDRH1, CDRH2 и CDRH3) и три вариабельных домена (CDR-участки) легкой цепи (CDRL1, CDRL2 и CDRL3). Размер CDR и каркасных участков (FR) определяют путем сравнения с компилированной базой данных аминокислотных последовательностей, в

которых такие участки были определены на основе варибельности последовательностей. Функциональные антигенсвязывающие центры могут включать меньшее количество CDR (т.е. когда специфичность связывания определяется тремя, четырьмя или пятью CDR). Например, для связывания может быть достаточно меньшего количества CDR, чем полный набор из 6 CDR. В некоторых случаях может быть достаточно VH- или VL-домена.

Специфичность антитела характеризует избирательное распознавание антителом конкретного эпитопа антигена. Например, встречающиеся в естественных условиях антитела являются моноспецифическими. В контексте настоящего описания понятие "моноспецифическое" антитело обозначает антитело, которое имеет один или несколько сайтов связывания, каждый из которых связывается с одним и тем же эпитопом одного и того же антигена.

Мультиспецифические антитела представляют собой биспецифические, три- или тетраспецифические антитела. Биспецифические антитела представляют собой антитела, которые имеют две различные антигенсвязывающие специфичности. Соответственно триспецифические антитела представляют собой антитела, которые имеют три различные антигенсвязывающие специфичности. Тетраспецифические антитела представляют собой антитела, которые имеют четыре различные антигенсвязывающие специфичности. Если антитело имеет более одной специфичности, то распознаваемые эпитопы могут быть ассоциированы с одним антигеном или с несколькими антигенами.

В контексте настоящего описания понятие "валентность" означает наличие определенного количества сайтов связывания в молекуле антитела. Например, встречающееся в естественных условиях антитело имеет два сайта связывания и является двухвалентным. Соответственно понятие "трехвалентный" означает наличие трех сайтов связывания в молекуле антитела.

Антитела могут содержать константные области иммуноглобулина из одного или нескольких классов иммуноглобулинов. Классы иммуноглобулинов включают изотипы IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, а в случае IgG и IgA также их подтипы. Антитело может иметь структуру константного домена, которая соответствует структуре антитела IgG-типа.

В контексте настоящего описания понятия "моноклональное антитело" или "композиция моноклонального антитела" относятся к препарату молекул антитела одинакового аминокислотного состава.

Понятие "химерное антитело" относится к антителу, содержащему варибельную область, т.е. связывающую область, полученную из одного и того же источника или вида, и по меньшей мере часть константной области, полученную из другого источника или вида, и его, как правило, получают с использованием методов рекомбинантной ДНК. Предпочтительными являются химерные антитела, которые содержат мышиную варибельную область и человеческую константную область. Другими предпочтительными формами "химерных антител", подпадающих под объем настоящего изобретения, являются антитела, константная область которых модифицирована или изменена по сравнению с исходным антителом с целью получения свойств прежде всего касательно связывания C1q и/или связывания Fc-рецептора (FcR). Такие химерные антитела обозначают так же, как "антитела переключенного класса". Химерные антитела являются продуктом экспрессии генов иммуноглобулинов, содержащих сегменты ДНК, которые кодируют варибельные области иммуноглобулинов, и сегменты ДНК, которые кодируют константные области иммуноглобулинов. Методы получения химерных антител включают обычные методы рекомбинантной ДНК и генной трансфекции, которые хорошо известны в данной области (см., например, Morrison S.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 1984, p. 6851-6855; US 5202238 и US 5204244).

Понятие "гуманизованное антитело" относится к антителам, в которых каркасные или "гиперварибельные участки" (CDR) модифицированы так, что они содержат CDR иммуноглобулина другой специфичности по сравнению со специфичностью родительского иммуноглобулина. Для получения "гуманизованного антитела" мышиный CDR трансплантируют в каркасный участок человеческого антитела (см., например, Riechmann L. et al., Nature, 332, 1988, p. 323-327; и Neuberger M.S. et al., Nature 314, 1985, p. 268-270). Другими формами "гуманизованных антител" являются антитела, константная область которых дополнительно модифицирована или изменена по сравнению с исходным антителом с целью получения свойств, прежде всего касательно связывания C1q и/или связывания Fc-рецептора (FcR).

Понятие "человеческое антитело" в контексте настоящего описания относится к антителам, варибельные и константные области которых получены из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Человеческие антитела хорошо известны в данной области (van Dijk M.A. и van de Winkel J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5, 2001, p. 368-374). Человеческие антитела можно получать также в трансгенных животных (например, мышах), которые в результате иммунизации могут продуцировать полный спектр или определенную часть человеческих антител при отсутствии производства эндогенного иммуноглобулина. Перенос набора генов иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии в такую мутантную мышиную зародышевую линию должен приводить к производству человеческих антител после антигенной стимуляции (см., например, Jakobovits A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1993, p. 2551-2555; Jakobovits A. et al., Nature 362, 1993, p. 255-258; Bruggemann M. et al., Year Immunol. 7, 1993, p. 33-40). Человеческие антитела можно получать также с помощью фаговых дисплейных библиотек (Hoogenboom H.R. и Winter G., J. Mol. Biol. 227, 1992, p. 381-388; Marks J.D. et al., J. Mol. Biol. 222,

1991, p. 581-597). Для получения человеческих моноклональных антител можно использовать также методы, разработанные Cole с соавторами и Voerner с соавторами (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, под ред. Alan R. Liss, 1985, p. 77; и Voerner P. et al., *J. Immunol.* 147, 1991, p. 86-95). Как уже было отмечено для химерных и гуманизированных антител, понятие "человеческое антитело" включает также такие антитела, константная область которых модифицирована с целью получения нужных свойств, прежде всего касательно связывания C1q и/или связывания FcR, например, путем "переключения класса", т.е. замены или мутации Fc-областей (например, IgG1 на IgG4 и/или IgG1/IgG4-мутация).

Понятие "рекомбинантное человеческое антитело" в контексте настоящего описания относится ко всем человеческим антителам, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют с помощью методов рекомбинации, например к антителам, выделенным из клетки-хозяина, такой как NS0- или СНО-клетка, или из животного (например, мыши), которое является трансгенным из-за присутствия человеческих генов иммуноглобулинов или антител, экспрессируемых с использованием рекомбинантного экспрессионного вектора, которым трансфектирована клетка-хозяин. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменную и константную области, которые находятся в преобразованной форме. Рекомбинантные человеческие антитела, можно подвергать соматической гипермутации *in vivo*. Таким образом, аминокислотные последовательности VH- и VL-областей рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и выведены из последовательностей VH и VL человеческой зародышевой линии и родственных им линий, могут не существовать в естественных условиях в спектре зародышевой линии человеческих антител *in vivo*.

Понятие "вариабельный домен" (вариабельный домен легкой цепи (VL), вариабельный домен тяжелой цепи (VH)) в контексте настоящего описания относится к областям каждой из пары легких и тяжелых цепей, которые участвуют непосредственно в связывании антитела с антигеном. Домены вариабельных человеческих легких и тяжелых цепей имеют одинаковую общую структуру, и каждый домен содержит четыре каркасных участка (FR), последовательности которых являются весьма консервативными, связанных тремя "гипервариабельными участками" (или определяющими комплементарность участками, CDR). Каркасные участки адаптированы к  $\beta$ -складчатой конформации, а CDR могут образовывать петли, соединяющие  $\beta$ -складчатую структуру. CDR в каждой цепи сохраняют их трехмерную структуру с помощью каркасных участков и образуют вместе с CDR из других цепей антигенсвязывающий центр. CDR3-участки тяжелых и легких цепей антитела играют особенно важную роль в специфичности связывания/аффинности антитела поэтому являются дополнительным объектом изобретения.

Понятия "гипервариабельный участок" или "антигенсвязывающий центр антитела" в контексте настоящего описания относятся к аминокислотным остаткам антитела, которые ответственны за связывания антигена. Гипервариабельный участок содержит аминокислотные остатки из "определяющих комплементарность участков" или "CDR". "Каркасные" или "FR"-участки представляют собой участки вариабельной области, отличные от указанных в настоящем описании остатков гипервариабельного участка. Таким образом, легкие и тяжелые цепи антитела содержат в направлении от N- к C-концу участки FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. CDR каждой цепи разделены аминокислотами указанного каркасного участка. В частности, CDR3 тяжелой цепи представляют собой участок, который вносит наибольший вклад в связывание с антигеном. CDR- и FR-участки определяют с помощью стандартной номенклатуры Кэбота (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

В контексте настоящего описания понятия "связывание", "который специфически связывается с" или "специфическое связывание" относятся к связыванию антитела с эпитопом антигена, что определяют путем анализа *in vitro*, предпочтительно с помощью анализа резонанса поверхностного плазмона (BIAcore®, фирма GE-Healthcare, Уппсала, Швеция) с использованием очищенного антигена дикого типа. Аффинность связывания характеризуют с помощью понятий  $k_a$  (константа скорости ассоциации антитела при формировании комплекса антитело/антиген),  $k_D$  (константа диссоциации) и  $K_D$  ( $k_D/k_a$ ). Наличие "связывания" или "специфического связывания с" означает, что аффинность связывания ( $K_D$ ) составляет  $10^{-8}$  моль/л или менее или от  $10^{-8}$  М до  $10^{-13}$  моль/л. Так, мультиспецифическое антитело специфически связывается с каждым антигеном, в отношении которого оно обладает специфичностью, что характеризуется аффинностью связывания ( $K_D$ ), составляющей  $10^{-8}$  моль/л или менее, в другом случае характеризуется аффинностью связывания ( $K_D$ ), составляющей от  $10^{-8}$  до  $10^{-13}$  моль/л. Мультиспецифическое антитело специфически связывается с его антигеном, что характеризуется аффинностью связывания ( $K_D$ ), составляющей от  $10^{-9}$  до  $10^{-13}$  моль/л.

Связывание антитела с Fc $\gamma$ RIII можно оценивать с помощью BIAcore®-анализа (фирма GE-Healthcare, Уппсала, Швеция). Аффинность связывания определяют с помощью понятий  $k_a$  (константа скорости ассоциации антитела при формировании комплекса антитело/антиген),  $k_D$  (константа диссоциации) и  $K_D$  ( $k_D/k_a$ ).

Понятие "эпитоп" включает любую полипептидную детерминанту, обладающую способностью специфически связываться с антителом. Эпитопная детерминанта может включать химически активные

поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорил или сульфонил, и они могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики и/или специфические характеристики заряда. Эпитоп представляет собой область антигена, с которой связывается антитело.

Антитело специфически связывается с антигеном, когда оно преимущественно распознает свой антиген-мишень в сложной смеси белков и/или макромолекул.

Мультиспецифическое антитело отличается тем, что указанное антитело может относиться к подклассу человеческого IgG1 или подклассу человеческого IgG1 с мутациями L234A и L235A (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Мультиспецифическое антитело отличается тем, что указанное антитело может относиться к подклассу человеческого IgG2.

Мультиспецифическое антитело отличается тем, что указанное антитело может относиться к подклассу человеческого IgG3.

Мультиспецифическое антитело отличается тем, что указанное антитело может относиться к подклассу человеческого IgG4 или подклассу человеческого IgG4 с дополнительной мутацией S228P (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Мультиспецифическое антитело отличается тем, что оно может относиться к подклассу человеческого IgG1 или человеческому подклассу IgG4.

Мультиспецифическое антитело отличается тем, что оно может относиться к подклассу человеческого IgG1 с мутациями L234A и L235A (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Мультиспецифическое антитело отличается тем, что оно может относиться к подклассу человеческого IgG1 с мутациями L234A, L235A и P329G (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Мультиспецифическое антитело может отличаться тем, что оно может относиться к подклассу человеческого IgG4 с мутациями S228P и L235E (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Мультиспецифическое антитело отличается тем, что оно может относиться к подклассу человеческого IgG4 с мутациями S228P, L235E и P329G (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

При создании настоящего изобретения было установлено, что мультиспецифические антитела, полученные с помощью заявленного способа получения, обладают улучшенными характеристиками, такими как биологическая или фармакологическая активность, фармакокинетические свойства или токсичность. Их можно применять, например, для лечения заболеваний, таких как рак.

В контексте настоящего описания понятие "константная область" обозначает совокупность доменов антитела, отличных от вариабельной области. Константная область не принимает непосредственного участия в связывании с антигеном, но она обладает различными эффекторными функциями. Антитела подразделяют в зависимости от аминокислотной последовательности константной области их тяжелых цепей на классы: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, а некоторые из них можно дополнительно подразделять на подклассы, такие как IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, IgA1 и IgA2. Константные области тяжелой цепи, соответствующие различным классам антител, обозначают символами  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$  соответственно. Константные области легкой цепи (CL), которые могут присутствовать во всех пяти классах антител, обозначают символами  $\kappa$  (каппа) и  $\lambda$  (лямбда). В контексте настоящего описания понятие "константная область", полученная из человеческого источника, обозначает константную область тяжелой цепи человеческого антитела подкласса IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 и/или константную область легкой каппа- или лямбда-цепи. Такие константные области хорошо известны в данной области, и они описаны, например, у Kabat E.A. et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е изд., изд-во, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

В контексте настоящего описания аминокислотные положения всех константных областей и доменов тяжелой и легкой цепей нумеруют согласно системе нумерации по Кэботу, описанной у Kabat E.A. et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, и обозначают в контексте настоящего описания как "нумерация согласно Кэботу". В частности систему нумерации по Кэботу (см. р. 647-660), которая описана у Kabat E.A. et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, применяют для константного домена легкой цепи CL каппа- и лямбда-изотипа и систему нумерации на основе EU-индекса Кэбота (см. р. 661-723) применяют для константных доменов тяжелой цепи (CH1, шарнир, CH2 и CH3, которую в контексте настоящего описания для большей ясности обозначают в этом случае как "нумерация согласно EU-индексу Кэбота").

В то время как антитела подкласса IgG4 обладают небольшой способностью к связыванию с Fc-рецептором (Fc $\gamma$ RIIIa), антитела других подклассов IgG характеризуются выраженной способностью к связыванию. Однако изменение таких остатков, как Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (утрата углевода Fc), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 и His435 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота), также приводит к снижению способности к связыванию с Fc-рецептором (Shields R.L. et al., *J. Biol. Chem.* 276, 2001, p. 6591-6604; Lund J. et al., *FASEB J.* 9, 1995, p. 115-119; Morgan A. et al., *Immunology* 86, 1995, p. 319-324; EP 0307434).

Антитело может обладать более низкой способностью к связыванию с FcR по сравнению с антите-

лом подкласса IgG1. Таким образом, родительское антитело с точки зрения связывания с FcR относится к подклассу IgG4 или подклассу IgG1 или IgG2, имеющему мутацию в S228, L234, L235 и/или D265 и/или содержащему мутацию PVA236 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). Мутации в родительском антителе могут представлять собой S228P, L234A, L235A, L235E и/или PVA236 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). Мутации в родительском антителе могут представлять собой S228P в случае IgG4 и L234A и L235A в случае IgG1 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Константная область антитела принимает непосредственное участие в ADCC (антитело-обусловленная клеточно-зависимая цитотоксичность) и CDC (комплементзависимая цитотоксичность). Активация комплемента (CDC) инициируется в результате связывания фактора C1q системы комплемента с константной областью антител большинства из подклассов IgG. Связывание C1q с антителом происходит в результате определенных белок-белковых взаимодействий в так называемом сайте связывания. Такие сайты связывания константных областей известны в данной области, и они описаны, например, у Lukas T.J. et al., *J. Immunol.* 127, 1981, p. 2555-2560; Bunkhouse R. и Cobra J.J., *Mol. Immunol.* 16, 1979, p. 907-917; Burton D.R. et al., *Nature* 288, 1980, p. 338-344; Thomason J.E. et al., *Mol. Immunol.* 37, 2000, p. 995-1004; Idiocies E.E. et al., *J. Immunol.* 164, 2000, p. 4178-4184; Hearer M. et al., *J. Virol.* 75, 2001, p. 12161-12168; Morgan A. et al., *Immunology* 86, 1995, p. 319-324; и в EP 0307434. Такими сайтами связывания константной области являются, например, сайты, в которых присутствуют аминокислоты L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Понятие "антитело-обусловленная клеточно-зависимая цитотоксичность (ADCC)" относится к лизису человеческих клеток-мишеней, опосредованному антигенсвязывающим белком в присутствии эффекторных клеток. Уровень ADCC оценивают предпочтительно путем обработки препарата экспрессирующих антиген клеток антигенсвязывающим белком в присутствии эффекторных клеток, таких как свежевыделенные мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) или очищенные эффекторные клетки из лейкоцитарных пленок, типа моноцитов или естественных клеток-киллеров (NK) или постоянно выращиваемой линии NK-клеток.

Понятие "комплементзависимая цитотоксичность (CDC)" обозначает процесс, инициируемый связыванием фактора C1q системы комплемента с Fc-фрагментом большинства подклассов антител IgG-изотипа. Связывание C1q с антителом происходит в результате определенных белок-белковых взаимодействий в так называемом сайте связывания. Такие сайты связывания Fc-фрагмента известны в данной области (см. выше). Такие сайты связывания Fc-фрагмента представляют собой сайты, в которых присутствуют аминокислоты L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329 (нумерация EU-индексу Кэбота). Антитела подклассов IgG1, IgG2 и IgG3, как правило, обладают способностью к активации комплемента, включая связывание с C1q и C3, в то время как IgG4 не активирует систему комплемента и не связывается с C1q и/или C3.

Клеточно-опосредованные эффекторные функции моноклональных антител можно усиливать путем конструирования его олигосахаридного компонента, как это описано у Umana P. et al., *Nature Biotechnol.* 17, 1999, p. 176-180 и в US 6602684. Антитела IgG1-типа, которые являются наиболее широко применяемыми терапевтическими антителами, представляют собой гликопротеины, которые имеют консервативный N-сцепленный сайт гликозилирования на Asn297 в каждом из доменов CH2. Два сложных биантенных олигосахарида, присоединенные к Asn297, расположены между CH2-доменами, формируя протяженные области контакта с полипептидным каркасом, и их присутствие является важным для опосредуемых антителом эффекторных функций, таких как антитело-обусловленная клеточно-зависимая цитотоксичность (ADCC) (Lifely M. R. et al., *Glycobiology* 5, 1995, p. 813-822; Jefferis R. et al., *Immunol. Rev.* 163, 1998, p. 59-76; Wright A. и Morrison S.L., *Trends Biotechnol.* 15, 1997, p. 26-32). В статье Umana P. et al., *Nature Biotechnol.* 17, 1999, p. 176-180 и в WO 99/54342 продемонстрировано, что сверхэкспрессия в клетках яичника китайского хомячка (CHO)  $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III ("GnTIII"), которая представляет собой гликозилтрансферазу, катализирующую образование разветвленных олигосахаридов, существенно повышает ADCC-активность антител *in vitro*. Изменения состава присоединенного к Asn297 углевода или его элиминация оказывают влияние также на связывание с Fc $\gamma$ R и C1q (Umana P. et al., *Nature Biotechnol.* 17, 1999, p. 176-180; Davies J. et al., *Biotechnol. Bioeng.* 74, 2001, p. 288-294; Mimura Y. et al., *J. Biol. Chem.* 276, 2001, p. 45539-45547; Radaev S. et al., *J. Biol. Chem.* 276, 2001, p. 16478-16483; Shields R.L. et al., *J. Biol. Chem.* 276, 2001, p. 6591-6604; Shields R.L. et al., *J. Biol. Chem.* 277, 2002, p. 26733-26740; Simmons L.C. et al., *J. Immunol. Methods* 263, 2002, p. 133-147).

Методы усиления клеточно-опосредуемых эффекторных функций моноклональных антител описаны, например, в WO 2005/018572, WO 2006/116260, WO 2006/114700, WO 2004/065540, WO 2005/011735, WO 2005/027966, WO 1997/028267, US 2006/0134709, US 2005/0054048, US 2005/0152894, WO 2003/035835, WO 2000/061739.

Мультиспецифическое антитело может быть гликозилированным (если оно содержит Fc-фрагмент антитела подкласса IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, предпочтительно подкласса IgG1 или IgG3) с сахарной цепью на Asn297, при этом количество фукозных остатков в указанной сахарной цепи составляет 65% или менее (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). Количество фукозных остатков в указанной сахар-

ной цепи составляет от 5 до 65%, предпочтительно от 20 до 40%. В контексте настоящего описания "Asn297" обозначает аминокислоту аспарагин, присутствующую примерно в положении 297 в Fc-фрагменте. Вследствие минорных вариаций последовательности антител Asn297 может располагаться также на несколько аминокислот (как правило, не более чем на  $\pm 3$  аминокислоты) дальше или ближе в направлении к C-концу по отношению к положению 297, т.е. между положениями 294 и 300. Гликозилированное антитело подкласса IgG может представлять собой человеческое антитело подкласса IgG1, человеческое антитело подкласса IgG1, имеющее мутации L234A и L235A, или антитело подкласса IgG3. Количество в указанной сахарной цепи остатков N-гликолилнейраминовой кислоты (NGNA) может составлять 1% или менее и/или количество остатков N-концевой альфа-1,3-галактозы составлять 1% или менее. Предпочтительно сахарная цепь обладает характеристиками N-сцепленных гликанов, присоединенных к Asn297 антитела, которое рекомбинантно экспрессируется в CHO-клетке.

Выражение "сахарная цепь обладает характеристиками N-сцепленных гликанов, присоединенных к Asn297 антитела, которое рекомбинантно экспрессируется в CHO-клетке" означает, что сахарная цепь на Asn297 родительского антитела имеет такую же структуру и последовательность сахарных остатков, за исключением фукозного остатка, что и антитело, экспрессируемое в немодифицированных CHO-клетках, например, как описано в WO 2006/103100.

В контексте настоящего описания понятие "NGNA" обозначает сахарный остаток N-гликолилнейраминовой кислоты.

Гликозилирование человеческого IgG1 или IgG3 имеет место на Asn297 в виде гликозилирования, осуществляемого с помощью сложного биантенного олигосахарида с коровым фукозилированием, на концах которого располагаются вплоть до 2 остатков Gal. Константные области человеческих тяжелых цепей подклассов IgG1 или IgG3 подробно описаны у Kabat E.A. et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 и у Brüggemann M. et al., *J. Exp. Med.* 166, 1987, p. 1351-1361; Love T.W. et al., *Methods Enzymol.* 178, 1989, p. 515-527. Эти структуры обозначают как гликановые остатки G0, G1 ( $\alpha 1,6$  или  $\alpha 1,3$ ) или G2 в зависимости от количества концевых остатков Gal (Raju T.S., *BioProcess Int.* 1, 2003, p. 44-53). CHO-тип гликозилирования Fc-фрагментов антитела описан, например, у Routier F.H., *Glycoconjugate J.* 14, 1997, p. 201-207. Антитела, которые рекомбинантно экспрессируются в CHO-клетках-хозяевах с немодифицированной схемой гликозилирования, как правило, являются фукозилированными на Asn297 по меньшей мере на 85%. Модифицированные олигосахариды в антителе могут быть гибридными или комплексными. Предпочтительно разветвленные восстановленные/нефукозилированные олигосахариды являются гибридными. Разветвленные восстановленные/нефукозилированные олигосахариды могут быть комплексными.

В контексте изобретения понятие "количество фукозы" означает количество указанного сахара в сахарной цепи на Asn297 по отношению к сумме всех гликоструктур, присоединенных к Asn 297 (например, комплексных, гибридных структур и структур с высоким содержанием маннозы), которое измеряют с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии и рассчитывают в виде среднего значения. Относительное количество фукозы выражают в виде процента содержащих фукозу структур относительно всех гликоструктур, идентифицированных с помощью MALDI-TOF в обработанном N-гликозидазой F образце (например, комплексных, гибридных структур, олиго-структур и структур с высоким содержанием маннозы соответственно).

Антитела могут связываться с различными антигенами. Ни первый антиген, ни второй антиген не представляют собой активирующий T-клетку антиген, а также ни первый антиген, ни второй антиген могут не представлять собой CD3. Антитело может также не связываться специфически с активирующим T-клетку антигеном или с CD3.

Первый или второй антиген может представлять собой человеческий TWEAK. Первый или второй антиген может представлять собой человеческий IL-17. Первый антиген может представлять собой человеческий TWEAK, а второй антиген представлять собой человеческий IL-17. В другом случае первый антиген может представлять собой человеческий IL-17, а второй антиген представлять собой человеческий TWEAK.

Человеческий TWEAK (UniProtKB 043508, TNF-подобный слабый индуктор апоптоза) представляет собой ассоциированный с клеточной поверхностью трансмембранный белок типа II. TWEAK описан у Chicheportiche Y. et al., *J. Biol. Chem.* 272, 1997, p. 32401-32410; Marsters S.A. et al., *Curr. Biol.* 8, 1998, p. 525-528; Lynch C.N. et al., *J. Biol. Chem.* 274, 1999, p. 8455-8459. Активная форма TWEAK представляет собой растворимый гомотример. Установлено, что последовательности связывающихся с рецептором доменов человеческого и мышинного TWEAK идентичны на 93%. TWEAK-рецептор Fn14 (индуцируемый фактором роста фибробластов белок, 14 кДа) представляет собой состоящий из 129 аминокислот (ак) трансмембранный белок типа I, лигандсвязывающий домен которого состоит из одного индивидуального богатого цистеином домена. Передача сигналов TWEAK происходит посредством активации пути NF-KB. мРНК TWEAK экспрессируется в различных тканях, и она обнаружена в большинстве основных органов типа сердца, головного мозга, скелетной мышцы и поджелудочной железы, в тканях,

связанных с иммунной системой, типа селезенки, лимфатических узлов и тимуса. мРНК Fn14 обнаружена в сердце, головном мозге, легком, плаценте, эпителиальных клетках (ЭК) сосудов и гладкомышечных клетках. Мыши, у которых "выключен" TWEAK (TWEAK-нуль) и Fn14 (Fn14-нуль), являются жизнеспособными, здоровыми и фертильными, у них выше содержание естественных клеток-киллеров и для них характерен повышенный врожденный воспалительный ответ. TWEAK принимает участие в апоптозе, пролиферации, ангиогенезе, он присутствует в области "ишемической полутени", обнаружен при церебральном отеке, рассеянном склерозе.

Человеческий IL-17 (другое название IL-17A; CTLA-8, Swiss Prot Q16552, IL-17) представляет собой провоспалительный цитокин, который продуцируется субпопуляцией Т-клеток-хелперов (которые обозначают как Th17), участвующий в патогенезе рассеянного склероза (РС). IL-17A играет роль в индукции других провоспалительных цитокинов, хемокинов и молекул адгезии. Обработка животных нейтрализующими IL-17A антителами снижала коэффициент заболеваемости и серьезность аутоиммунного энцефаломиелита (Komiyama Y. et al., *J. Immunol.* 177, 2006, p. 566-573). Обнаружена сверхэкспрессия IL-17A в спинномозговой жидкости страдающих РС пациентов (Hellings P.W. et al., *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 28, 2003, p. 42-50; Matusevicius D. et al., *Multiple Sclerosis* 5, 1999, p. 101-104; WO 2005/051422). Кроме того, нейтрализующие IL-17A антитела снижают серьезность и коэффициент заболеваемости ревматоидным артритом (РА) на мышинной модели индуцированного коллагеном артрита, а высокие уровни IL-17A можно обнаружить в синовиальной жидкости воспаленных суставов у страдающих РА пациентов (Ziolkowska M et al., *J. Immunol.* 164, 2000, p. 2832-2838; Kotake S. et al., *J. Clin. Invest.* 103, 1999, p. 1345-1352; Hellings P.W. et al., *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 28, 2003, p. 42-50).

Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирует антитело. Методы рекомбинантного получения хорошо известны в данной области, и они включают осуществление экспрессии белка в прокариотических и эукариотических клетках и последующее выделение антитела и, как правило, очистку до достижения фармацевтически приемлемой степени чистоты. Для осуществления экспрессии указанных выше антител в клетке-хозяине нуклеиновые кислоты, кодирующие соответствующие модифицированные легкие и тяжелые цепи, встраивают в экспрессионные векторы с помощью стандартных методов. Экспрессию осуществляют в соответствующих прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах, таких как CHO-клетки, NS0-клетки, SP2/0-клетки, HEK293-клетки, COS-клетки, PER.C6-клетки, клетки дрожжей или клетки *E.coli*, и антитело выделяют из клеток (из супернатанта или клеток после лизиса). Общие методы рекомбинантного получения антител хорошо известны из существующего уровня техники, и они описаны, например, в обзорных статьях Makrides S.C., *Protein Expr. Purif.* 17, 1999, p. 183-202; Geisse S. et al., *Protein Expr. Purif.* 8, 1996, p. 271-282; Kaufman R.J., *Mol. Biotechnol.* 16, 2000, p. 151-161; Werner R.G., *Drug Res.* 48, 1998, p. 870-880.

Антитела, продуцируемые клетками-хозяевами, можно подвергать посттрансляционному отщеплению одной или нескольких, прежде всего одной или двух аминокислот от С-конца тяжелой цепи. Таким образом, антитело, продуцируемое клеткой-хозяином путем экспрессии молекулы специфической нуклеиновой кислоты, которая кодирует полноразмерную тяжелую цепь, может включать полноразмерную тяжелую цепь, или оно может включать расщепленный вариант полноразмерной тяжелой цепи (который обозначают также как расщепленный вариант тяжелой цепи). Это может иметь место в случае, когда две последние С-концевые аминокислоты тяжелой цепи представляют собой глицин (G446) и лизин (K447, нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Таким образом, в контексте настоящего изобретения подразумевается, что аминокислотные последовательности тяжелых цепей, включающих СН3-домены, не имеют С-концевого дипептида глицин-лизин, если не указано иное.

Антитело, которое содержит тяжелую цепь, включающую СН3-домен, указанный в настоящем описании, содержит дополнительный С-концевой дипептид глицин-лизин (G446 и K447, нумерация согласно EU-индексу Кэбота). Антитело, которое содержит тяжелую цепь, включающую СН3-домен, указанный в настоящем описании, может содержать дополнительный С-концевой остаток глицина (G446, нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Фармацевтические композиции могут содержать популяцию антител. Популяция антител может содержать антитела, имеющие полноразмерную тяжелую цепь, и антитела, имеющие расщепленный вариант тяжелой цепи. Популяция антител может состоять из смеси антител, которые имеют полноразмерную тяжелую цепь, и антител, которые имеют расщепленный вариант тяжелой цепи, в которой по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% приходится на долю антител, имеющих расщепленный вариант тяжелой цепи.

Фармацевтическая композиция может содержать антитело, которое содержит тяжелую цепь, включающую СН3-домен, указанный в настоящем описании, с дополнительным С-концевым дипептидом глицин-лизин (G446 и K447, нумерация согласно EU-индексу Кэбота). Фармацевтическая композиция может содержать антитело, которое содержит тяжелую цепь, включающую СН3-домен, указанный в настоящем описании, с дополнительным С-концевым остатком глицина (G446, нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Фармацевтическая композиция может содержать популяцию антител, которая содержит антитела,

содержащие тяжелую цепь, которая включает СНЗ-домен, указанный в настоящем описании; антитела, содержащие тяжелую цепь, которая включает СНЗ-домен, указанный в настоящем описании, с дополнительным С-концевым остатком глицина (G446, нумерация согласно EU-индексу Кэбота); и антитела, содержащие тяжелую цепь, которая включает СНЗ-домен, указанный в настоящем описании, с дополнительным С-концевым дипептидом глицин-лизин (G446 и K447, нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Мультиспецифические антитела можно отделять от культуральной среды с помощью общепринятых методов очистки иммуноглобулинов, таких, например, как, хроматография на белок А-сефарозе, хроматография на гидроксилатапите, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография. ДНК и РНК, которые кодируют моноклональные антитела, можно легко выделять и секвенировать с помощью общепринятых методов. Клетки гибридом могут служить источником таких ДНК и РНК. После выделения ДНК можно встраивать в экспрессионные векторы, которыми затем трансфектируют клетки-хозяева, такие как НЕК293-клетки, СНО-клетки или клетки миеломы, которые в ином случае не могут продуцировать белок иммуноглобулина, для обеспечения синтеза рекомбинантных моноклональных антител в клетках-хозяевах.

Варианты (или мутанты) аминокислотной последовательности мультиспецифического антитела создаются путем внесения соответствующих нуклеотидных изменений в ДНК антитела или с помощью нуклеотидного синтеза. Однако такие модификации можно осуществлять лишь в очень ограниченном масштабе, например, как указано выше. Например, модификации не должны приводить к изменению указанных выше характеристик антитела, таких как изотип IgG и способность связываться с антигеном, но они могут повышать выход рекомбинантного продукта, стабильность белка или облегчать процесс очистки. Антитела могут иметь одну или несколько консервативных аминокислотных замен.

Аминокислоты можно группировать на основе общих свойств боковых цепей следующим образом:

- (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислотные: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Таблица 1. Специфические свойства аминокислот

Аминокислота	3-буквенный код	1-буквенный код	Полярность боковой цепи	Заряд боковой цепи (pH 7,4)
аланин	Ala	A	неполярная	нейтральный
аргинин	Arg	R	основная полярная	<b>положительный</b>
аспарагин	Asn	N	полярная	нейтральный
аспарагиновая кислота	Asp	D	кислотная полярная	<b>отрицательный</b>
цистеин	Cys	C	неполярная	нейтральный
глутаминовая кислота	Glu	E	кислотная полярная	<b>отрицательный</b>
глутамин	Gln	Q	полярная	нейтральный
глицин	Gly	G	неполярная	нейтральный
гистидин	His	H	основная полярная	<b>положительный (10%) нейтральный (90%)</b>
изолейцин	Ile	I	неполярная	нейтральный
лейцин	Leu	L	неполярная	нейтральный
лизин	Lys	K	основная полярная	<b>положительный</b>
метионин	Met	M	неполярная	нейтральный
фенилаланин	Phe	F	неполярная	нейтральный
пролин	Pro	P	неполярная	нейтральный
серин	Ser	S	полярная	нейтральный
треонин	Thr	T	полярная	нейтральный
триптофан	Trp	W	неполярная	нейтральный
тирозин	Tyr	Y	полярная	нейтральный
валин	Val	V	неполярная	нейтральный

В контексте настоящего описания понятие "клетка-хозяин" относится к клеточной системе любого типа, которую можно сконструировать так, чтобы она продуцировала антитела. В качестве клеток-хозяев можно применять НЕК293-клетки и СНО-клетки. В контексте настоящего описания понятия "клетка", "клеточная линия" и "клеточная культура" используются взаимозаменяемо, и все определения, в которые входят эти понятия, включают потомство. Так, выражения "трансформанты" и "трансформированные клетки" включают прежде всего первичные рассматриваемые клетки, а также культуры, происходящие из них, независимо от количества переносов. Следует также иметь в виду, что все потомство может не быть строго идентичным касательно содержания ДНК вследствие случайных или неумышленных мутаций. Эти понятия включают варианты потомства, которые обладают такой же функцией или биологической активностью, что и отобранная путем скрининга исходная трансформированная клетка. Если употребляются другие обозначения, то они должны быть ясны из контекста.

Экспрессия в NS0-клетках описана, например, у Barnes L.M. et al., *Cytotechnology* 32, 2000, p. 109-123; Barnes L.M. et al., *Biotech. Bioeng.* 73, 2001, p. 261-270. Кратковременная экспрессия описана, например, у Durocher Y. et al., *Nucl. Acids. Res.* 30, 2002, p. E9. Клонирование варибельных доменов описано у Orlandi R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1989, p. 3833-3837; Carter P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1992, p. 4285-4289; и Norderhaug L. et al., *J. Immunol. Methods* 204, 1997, p. 77-87. Предпочтительная система для кратковременной экспрессии (НЕК293) описана Schlaeger E.-J. и Christensen K. в *Cytotechnology* 30, 1999, p. 71-83 и у Schlaeger E.-J., *J. Immunol. Methods* 194, 1996, p. 191-199.

Контролирующие последовательности, которые можно применять для прокариотических организмов, представляют собой, например, промоторную последовательность, необязательно операторную последовательность и сайт связывания рибосом. Известно, что для эукариотических клеток применяют промоторы, энхансеры и сигналы полиаденилирования.

Нуклеиновая кислота "функционально связана", когда она находится в функциональной связи с другой нуклеотидной последовательностью. Например, ДНК предпоследовательности или лидерной секреторной последовательности функционально связана с ДНК полипептида, если при ее экспрессии образуется предбелок, который участвует в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он оказывает воздействие на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосом функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен так, что облегчает трансляцию. Как правило, понятие "функционально связаны" означает, что последовательности ДНК, будучи связаны, являются смежными, а в случае лидерной секреторной последовательности являются смежными и находятся в рамке считывания. Однако для энхансеров не является необходимым, чтобы они были смежными. Связывание осуществляют путем лигирования в соответствующих сайтах рестрикции. Если такие сайты не существуют, то в соответствии с принятой практикой применяют синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры.

Очистку антител для удаления других клеточных компонентов или других примесей, например других клеточных нуклеиновых кислот или белков, осуществляют с помощью стандартных методов, включая обработку щелочью/ДСН, CsCl-бэндинг, хроматографию на колонках, электрофорез в агарозном геле и другие методы, хорошо известные в данной области (см. в *Current Protocols in Molecular Biology*, под ред. Ausubel F. et al., изд-во Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987). Для очистки белков разработаны и нашли широкое распространение различные методы, такие как аффинная хроматография с использованием белков микроорганизмов (например, аффинная хроматография на белке А или белке G), ионообменная хроматография (например, катионообменная (с использованием карбоксиметилловых смол), анионообменная (с использованием аминоэтиловых смол) хроматография и хроматография со смешанной формой разделения), тиофильная адсорбция (например, с использованием бета-меркаптоэтанола и других SH-лигандов), хроматография на основе гидрофобного взаимодействия или адсорбционная хроматография ароматических соединений (например, с использованием фенилсефарозы, аза-аренофильных смол или мета-аминофенилбороновой кислоты), металлхелатирующая аффинная хроматография (например, с использованием материала, обладающего аффинностью к Ni(II) и Cu(II)), гель-фильтрация и электрофоретические методы (такие как гель-электрофорез, капиллярный электрофорез) (Vijayalakshmi M.A., *Appl. Biochem. Biotech.* 75, 1998, p. 93-102).

Антитело может быть включено в состав препаративной формы в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

Мультиспецифическое антитело может быть предназначено для лечения воспалительных заболеваний, аутоиммунных заболеваний, ревматоидного артрита, псориатического артрита, мышечных болезней, например мышечной дистрофии, рассеянного склероза, хронических заболеваний почек, болезней костной ткани, например дегенерации кости при множественной миеломе, системной красной волчанки, волчаночного нефрита и сосудистых повреждений.

В контексте настоящего описания понятие "фармацевтический носитель" включает любой и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, придающие изотоничность и замедляющие абсорбцию агенты и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Предпочтительно носитель можно применять для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии).

Фармацевтическую композицию можно вводить с помощью различных методов, известных в данной области. Как должно быть очевидно специалисту в данной области, путь и/или форму введения можно варьировать в зависимости от требуемых результатов. Для реализации назначения соединения можно наносить на соединение покрытие из материала, препятствующего его инактивации, или осуществлять введение соединения совместно с таким материалом. Например, соединение можно вводить индивидууму в соответствующем носителе, например в липосомах или в разбавителе. К фармацевтически приемлемым разбавителям относятся физиологический раствор и водные забуферивающие растворы. К фармацевтическим носителям относятся стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий непосредственно перед введением. Применение таких сред и агентов для обладающих фармацевтической активностью субстан-

ций известно в данной области.

В контексте настоящего описания понятия "парентеральное введение" и "введение парентеральным путем" означают пути введения, отличные от энтерального введения и местного применения, как правило, они относятся к введению путем инъекции и включают (но не ограничиваясь только ими) внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, внутриоболочечную, внутрикапсульную, внутриглазную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интратермальную инъекцию и инфузию.

В контексте настоящего описания понятие "рак" относится к пролиферативным заболеваниям, таким как лимфомы, лимфолейкозы, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого (NSCL), альвеолярно-клеточный рак легкого, рак кости, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожная или внутриглазная меланома, рак матки, рак яичника, ректальный рак, рак анальной области, рак желудка, гастральный рак, рак ободочной кишки, рак молочной железы, карцинома фаллопиевых труб, карцинома эндометрия, карцинома шейки матки, карцинома влагалища, карцинома вульвы, болезнь Ходжкина, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечников, саркома мягких тканей, рак мочеиспускательного канала, рак пениса, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, почечно-клеточная карцинома, карцинома почечной лоханки, мезотелиома, печеночно-клеточный рак, билиарный рак, неоплазмы центральной нервной системы (ЦНС), опухоли позвоночника, глиома ствола головного мозга, мультиформная глиобластома, астроцитомы, шванномы, эпендимомы, медуллобластомы, менингиомы, плоскоклеточные карциномы, аденома гипофиза и саркома Юинга, включая рефрактерные варианты любого из указанных выше видов рака и комбинации одного или нескольких видов рака.

Композиции могут содержать также адьюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгаторы и диспергирующие агенты. Отсутствие микроорганизмов можно обеспечивать как с помощью процедур стерилизации (см. выше), так и путем включения различных антибактериальных и противогрибковых средств, таких, например, как парабен, хлорбутанол, фенол, сорбиновая кислота и т.п. Может оказаться целесообразным включать в композиции агенты для придания изотоничности, такие как сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, можно пролонгировать абсорбцию инъекционной фармацевтической формы путем включения веществ, которые замедляют абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Вне зависимости от выбранного пути введения соединения можно применять в пригодной гидратированной форме, и/или фармацевтические композиции приготавливают в виде фармацевтически приемлемых форм лекарственного средства с помощью общепринятых методов, известных специалистам в данной области.

Фактические уровни доз действующих веществ в фармацевтических композициях можно варьировать для получения количества действующего вещества, которое является эффективным для достижения требуемого терапевтического ответа у конкретного пациента при использовании конкретной композиции и пути введения, но не является токсичным для пациента. Выбранный уровень доз должен зависеть от различных фармакокинетических факторов, включая активность конкретных применяемых композиций, путь введения, время введения, скорость экскреции конкретного применяемого соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, которые используют в сочетании с конкретными применяемыми композициями, возраст, пол, вес, состояние, общее состояние здоровья и предшествующая история болезни пациента, подлежащего лечению, и другие подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

Композиция должна быть стерильной и текучей в той степени, чтобы ее можно было вводить с помощью шприца. Помимо воды предпочтительным носителем является изотонический забуференный физиологический раствор.

Соответствующую текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительно включать в композицию агенты для придания изотоничности, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит или сорбит, и хлорид натрия.

В контексте настоящего описания понятие "трансформация" относится к процессу переноса векторов/нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Если в качестве клеток-хозяев применяют клетки, оболочки которых не представляют собой труднопреодолимые барьеры, то трансфекцию осуществляют, например, методом, основанным на осаждении фосфатом кальция, который описан у Graham и Van der Eh, *Virology*, 52, 1978, p. 546 и далее. Однако можно применять также и другие методы интродукции ДНК в клетки, такие как инъекция в ядра или слияние протопластов. Если используют прокариотические клетки или клетки, имеющие значительные клеточные оболочки, то в качестве метода трансфекции можно применять обработку кальцием с использованием хлорида кальция, описанную у Cohen F.N. et al., *PNAS* 69, 1972, p. 7110 и далее.

В контексте настоящего описания понятие "экспрессия" относится к процессу, посредством которого осуществляется транскрипция нуклеиновой кислоты в мРНК, и/или к процессу, посредством которого транскрибированная мРНК (которую называют также транскриптом) впоследствии транслируется с образованием пептидов, полипептидов или белков. Транскрипты и кодируемые полипептиды в целом называют генным продуктом. Если полинуклеотид происходит из геномной ДНК, то экспрессия в эукариотической клетке может включать сплайсинг мРНК.

"Вектор" представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, в частности самореплицирующуюся, которая переносит встроенную молекулу нуклеиновой кислоты в клетки-хозяева и/или между клетками-хозяевами. Понятие включает векторы, функция которых состоит прежде всего во встраивании ДНК или РНК в клетку (например, хромосомная интеграция), в репликационные векторы, функция которых прежде всего состоит в репликации ДНК или РНК, и экспрессионные векторы, функция которых состоит прежде всего в транскрипции и/или трансляции ДНК или РНК. Под понятие подпадают также векторы, которые обладают несколькими указанными функциями.

"Экспрессионный вектор" представляет собой полинуклеотид, который при интродукции в соответствующую клетку-хозяина может транскрибироваться и транслироваться в полипептид. Понятие "экспрессионная система" относится, как правило, к приемлемой клетке-хозяину, содержащей экспрессионный вектор, функцией которой может быть выход требуемого продукта экспрессии.

Следующие примеры, перечень последовательностей и чертежи даны с целью лучшего понимания настоящего изобретения, полный объем которого представлен в приведенной ниже формуле изобретения. Очевидно, что могут быть сделаны модификации в изложенных процедурах без отклонения от сути изобретения.

Описание аминокислотных последовательностей

- SEQ ID NO: 1 - легкая цепь (LC) <Ang-2> дикого типа (wt),
- SEQ ID NO: 2 - тяжелая цепь (HC) <Ang-2> дикого типа (wt),
- SEQ ID NO: 3 - тяжелая цепь (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом дикого типа (wt),
- SEQ ID NO: 4 - легкая цепь (LC) <VEGF> с VH-VL-обменом дикого типа (wt),
- SEQ ID NO: 5 - легкая цепь (LC) <Ang-2> с заменой Q124K,
- SEQ ID NO: 6 - тяжелая цепь (HC) <Ang-2> с заменой K147E,
- SEQ ID NO: 7 - тяжелая цепь (HC) <Ang-2> с заменой K213E,
- SEQ ID NO: 8 - легкая цепь (LC) <Ang-2> с заменой E123K,
- SEQ ID NO: 9 - легкая цепь (LC) <Ang-2> с заменой Q124K и заменой E123K,
- SEQ ID NO: 10 - тяжелая цепь (HC) <Ang-2> с заменой K147E и заменой K213E,
- SEQ ID NO: 11 - легкая цепь (LC) <Ang-2> с заменой Q124R и заменой E123K,
- SEQ ID NO: 12 - легкая цепь (LC) <VEGF> с заменой Q124E,
- SEQ ID NO: 13 - легкая цепь (LC) <Ang-2> с заменой E124K и заменой E123K,
- SEQ ID NO: 14 - тяжелая цепь (HC) <Ang-2> с заменой K147E и заменой K213D,
- SEQ ID NO: 15 - легкая цепь (LC) <IL-17> дикого типа (wt),
- SEQ ID NO: 16 - тяжелая цепь (HC) <IL-17> дикого типа (wt),
- SEQ ID NO: 17 - тяжелая цепь (HC) <TWEAK> с VH-VL-обменом дикого типа (wt),
- SEQ ID NO: 18 - легкая цепь (LC) <TWEAK> с VH-VL-обменом дикого типа (wt),
- SEQ ID NO: 19 - легкая цепь (LC) <IL-17> с заменой Q124K и заменой E123R,
- SEQ ID NO: 20 - тяжелая цепь (HC) <IL-17> с заменой K147E и заменой K213E,
- SEQ ID NO: 21 - легкая цепь (LC) <TWEAK> с заменой Q124E,
- SEQ ID NO: 22 - тяжелая цепь (HC) <IL-17> с заменой K147E и заменой K213D,
- SEQ ID NO: 23 - легкая цепь (LC) <IL-17> с заменой Q124K и заменой E123K
- SEQ ID NO: 24 - вариабельный домен тяжелой цепи VH <TWEAK > 305-HC4,
- SEQ ID NO: 25 - вариабельный домен легкой цепи VL <TWEAK>305-LC2,
- SEQ ID NO: 26 - вариабельный домен тяжелой цепи VH <IL-17> HC136,
- SEQ ID NO: 27 - вариабельный домен легкой цепи VL <IL-17> LC136,
- SEQ ID NO: 28 - тяжелая цепь (HC) <TWEAK> с VH-VL-обменом дикого типа (wt) (содержащая концевой дипептид GK),
- SEQ ID NO: 29 - тяжелая цепь (HC) <IL-17> с заменой K147E и заменой K213E (содержащая концевой дипептид GK),
- SEQ ID NO: 30 - тяжелая цепь (HC) <IL-17> с заменой K147E и заменой K213D (содержащая концевой дипептид GK),
- SEQ ID NO: 31 - тяжелая цепь (HC) <Ang-2> дикого типа (wt) (содержащая концевой дипептид GK),
- SEQ ID NO: 32 - тяжелая цепь (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом дикого типа (wt) (содержащая концевой дипептид GK),
- SEQ ID NO: 33 - тяжелая цепь (HC) <Ang-2> с заменой K147E (содержащая концевой дипептид GK),
- SEQ ID NO: 34 - тяжелая цепь (HC) <Ang-2> с заменой K213E (содержащая концевой дипептид GK),

SEQ ID NO: 35 - тяжелая цепь (HC) <Ang-2> с заменой K147E и заменой K213E (содержащая концевой дипептид GK),

SEQ ID NO: 36 - тяжелая цепь (HC) <Ang-2> с заменой K147E и заменой K213D (содержащая концевой дипептид GK),

SEQ ID NO: 37 - тяжелая цепь (HC) <IL-17> дикого типа (wt) (содержащая концевой дипептид GK),

SEQ ID NO: 38 - тяжелая цепь (HC) Fab<sub>2</sub>-CrossFab, включающая две тяжелые цепи (HC) <Ang-2> дикого типа (wt), сцепленные с одной тяжелой цепью (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом дикого типа (wt) через глицин-сериновые линкеры,

SEQ ID NO: 39 - тяжелая цепь (HC) Fab<sub>2</sub>-CrossFab, включающая две тяжелые цепи (HC) <Ang-2> с заменами K147E и K213E-, сцепленные с одной тяжелой цепью (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом дикого типа (wt) через глицин-сериновые линкеры,

SEQ ID NO: 40 - тяжелая цепь (HC) CrossFab-Fab, включающая одну тяжелую цепь (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом дикого типа (wt), сцепленную с одной тяжелой цепью (HC) <Ang-2> с заменами K147E и K213E через глицин-сериновые линкеры,

SEQ ID NO: 41 - тяжелая цепь (HC) CrossFab-Fab, включающая одну тяжелую цепь (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом дикого типа (wt), сцепленную с одной тяжелой цепью (HC) <Ang-2> с заменами K147E и K213E через глицин-сериновые линкеры,

SEQ ID NO: 42 - тяжелая цепь (HC) CrossFab<sub>2</sub>-Fab, включающая две тяжелые цепи (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом дикого типа (wt), сцепленные с одной тяжелой цепью (HC) <Ang-2> дикого типа (wt) через глицин-сериновые линкеры,

SEQ ID NO: 43 - тяжелая цепь (HC) CrossFab<sub>2</sub>-Fab, включающая две тяжелые цепи (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом дикого типа (wt), сцепленные с одной тяжелой цепью (HC) <Ang-2> с заменами K147E и K231E через глицин-сериновые линкеры,

SEQ ID NO: 44 - тяжелая цепь (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом с заменой K147E,

SEQ ID NO: 45 - легкая цепь (LC) <VEGF> с VH-VL-обменом с заменой Q124K,

SEQ ID NO: 46 - тяжелая цепь (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом с заменами K147E и K213E,

SEQ ID NO: 47 - легкая цепь (LC) <VEGF> с VH-VL-обменом с E123K и заменой Q124K.

### Примеры

Материалы и общие методы.

Общая информация, касающаяся нуклеотидных последовательностей легких и тяжелых цепей человеческого иммуноглобулина, представлена у Kabat E.A. et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Аминокислоты цепей антител пронумерованы и на них сделаны ссылки согласно системам нумерации, предложенным Кэботом (Kabat E.A. et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991), описанным выше.

Методы рекомбинантной ДНК.

Для манипуляций с ДНК использовали стандартные методы, описанные у Sambrook J. et al., *Molecular cloning: A laboratory manual*; изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Реагенты для молекулярной биологии использовали согласно инструкциям производителей.

Синтез генов.

Требуемые сегменты генов получали из олигонуклеотидов, созданных путем химического синтеза. Генные сегменты длиной 600-1800 пар оснований, которые фланкированы единичными сайтами, распознаваемыми рестриктазами, собирали путем отжига и лигирования олигонуклеотидов, включая ПЦР-амплификацию и последующее клонирование через указанные сайты рестрикции, например KpnI/SacI или AscI/PacI в клонирующем векторе pGA4, основой которого является плазмида pPCRScripT (фирма Stratagene). Последовательности ДНК субклонированных генных фрагментов подтверждали путем секвенирования ДНК. Синтез генных фрагментов заказывали в соответствии с настоящей спецификацией на фирме Geneart (Регенсбург, Германия).

Определение последовательностей ДНК.

Последовательности ДНК определяли путем секвенирования двух цепей на фирме MediGenomix GmbH (Мартинсрид, Германия) или фирме Sequiserve GmbH (Фатерштетген, Германия).

Анализ последовательностей ДНК и белков и обработка данных о последовательностях.

Применяли пакет программ фирмы GCG (Genetics Computer Group, Мэдисон, шт. Висконсин), версия 10.2 и Infomax's Vector NT1 Advance suite, версия 8.0 для создания, картирования, анализа, аннотирования и иллюстрации последовательностей.

Экспрессионные векторы.

Для экспрессии описанных антител применяли варианты экспрессионных плазмид, предназначенных для кратковременной экспрессии (например, в клетках HEK293 EBNA или HEK293-F), основанные либо на кДНК-организации промотора CMV с интроном А или без него, либо на геномной организации с промотором CMV.

Помимо кассеты экспрессии антитела векторы включали: сайт инициации репликации, который обеспечивает репликацию этого вектора в *E. coli*, ген  $\beta$ -лактамазы, который придает устойчивость *E. coli* к ампициллину. Транскрипционная единица гена антитела состояла из следующих элементов: уникальный(ые) сайт(ы) рестрикции на 5'-конце, немедленно-ранний энхансер и промотор из человеческого цитомегаловируса, расположенная за ней последовательность интрона А в случае конструкции на основе кДНК, 5'-нетранслируемая область гена человеческого антитела, сигнальная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина, цепь человеческого антитела (дикого типа или с обменом доменов) либо в виде кДНК, либо в виде геномной организации с иммуноглобулиновой экзон-интронной организацией, 3'-нетранслируемая область с сигнальной последовательностью полиаденилирования и уникальный(ые) сайт(ы) рестрикции на 3'-конце.

Слияния генов, содержащих описанные цепи антитела, как указано ниже, осуществляли с помощью ПЦР и/или синтеза генов и сборки с использованием известных методов и процедур рекомбинации путем соединения соответствующих сегментов нуклеиновых кислот, например с использованием уникальных сайтов рестрикции, в соответствующих векторах. Субклонированные нуклеотидные последовательности подтверждали секвенированием ДНК. Для осуществления кратковременных трансфекций плазмиды создавали в больших количествах посредством получения плазмид из трансформированных культур *E. coli* (набор Nucleobond AX, фирма Macherey-Nagel).

Методики культивирования клеток.

Применяли стандартные методики культивирования клеток, описанные в *Current Protocols in Cell Biology*, под ред. Bonifacino J.S., Dasso M., Harford J.B., Lippincott-Schwartz J. и Yamada K.M., изд-во John Wiley & Sons, Inc., 2000.

Мультиспецифические антитела экспрессировали путем кратковременной котрансфекции соответствующими экспрессионными плазмидами выращенных в виде прикрепленных культур клеток HEK293-EBNA или выращенных в виде суспензионных культур клеток HEK29-F, что будет описано ниже.

Кратковременные трансфекции в системе HEK293-EBNA.

Мультиспецифические антитела экспрессировали путем кратковременной котрансфекции соответствующими экспрессионными плазмидами (например, кодирующими тяжелую и модифицированную тяжелую цепь, а также соответствующую легкую цепь и модифицированную легкую цепь) выращенных в виде прикрепленных культур клеток HEK293-EBNA (линия клеток почки человеческого эмбриона 293, экспрессирующая ядерный антиген вируса Эпштейна-Барра; депонирована в Американской коллекции типовых культур под номером ATCC CRL-10852, партия 959218), которые культивировали в среде DMEM (модифицированная по методу Дульбекко среда Игла, Gibco®), дополненной 10% FCS (фетальная телячья сыворотка, Gibco®) с ультранизким содержанием IgG (Ultra Low IgG FCS), 2м М L-глутамином (Gibco®) и 250 мкг/мл генетицина (Gibco®). Для трансфекции применяли реагент для трансфекции типа FuGENE™ 6 (фирма Roche Molecular Biochemicals), используя соотношение реагента FuGENE™ (мкл) и ДНК (мкг) 4:1 (диапазон от 3:1 до 6:1). Белки экспрессировали, применяя соответствующие плазмиды, с использованием плазмид, кодирующих (модифицированные и дикого типа) легкую цепь и тяжелую цепь, в молярном соотношении 1:1 (эквивалентное соотношение), диапазон от 1:2 до 2:1 соответственно. Клетки подпитывали в день 3 L-глутамином до концентрации 4 мМ, глюкозой (фирма Sigma) и NAA (амид никотиновой кислоты) (Gibco®). В дни с 5 по 11 после трансфекции собирали путем центрифугирования супернатанты клеточных культур, содержащие мультиспецифическое антитело, и хранили при -20°C. Общую информацию, касающуюся рекомбинантной экспрессии человеческих иммуноглобулинов, например, в HEK293-клетках, см. у Meissner P. et al., *Biotechnol. Bioeng.* 75, 2001, p. 197-203.

Кратковременные трансфекции в системе HEK293-F.

Мультиспецифические антитела получали путем кратковременной трансфекции соответствующими плазмидами (например, кодирующими тяжелую и модифицированную тяжелую цепь, а также соответствующую легкую цепь и модифицированную легкую цепь), используя систему HEK293-F (фирма Invitrogen) согласно инструкции производителя. В целом, метод состоял в следующем: HEK293-F-клетки (фирма Invitrogen), выращенные в виде суспензионной культуры либо во встряхиваемой колбе, либо в ферментере с мешалкой в бессывороточной среде для экспрессии типа FreeStyle™ 293 (фирма Invitrogen), трансфектировали смесью четырех экспрессионных плазмид и 293-фектином™ или фектином (фирма Invitrogen). В 2-литровую встряхиваемую колбу (фирма Corning) высевали клетки HEK293-F с плотностью  $1,0 \times 10^6$  клеток/мл в 600 мл и инкубировали при 120 об/мин, 8% CO<sub>2</sub>. Через 1 день клетки трансфектировали при плотности клеток примерно  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл с помощью примерно 42 мл смеси А), содержащей 20 мл среды Opti-MEM (фирма Invitrogen), с 600 мкг общей плазмидной ДНК (1 мкг/мл), которая кодирует соответственно тяжелую или модифицированную тяжелую цепь и

соответствующую легкую цепь, в эквимольном соотношении, и смеси Б), содержащей 20 мл Opti-MEM + 1,2 мл 293-фектина или фектина (2 мкл/мл). В зависимости от поглощения глюкозы в процессе ферментации добавляли раствор глюкозы. Через 5-10 дней собирали супернатант, содержащий секретированное антитело, и либо очищали антитела непосредственно из супернатанта, либо супернатант замораживали и помещали на хранение.

#### Определение белка.

Концентрацию белков очищенных антител и их производных определяли на основе оптической плотности (ОП) при 280 нм, используя коэффициент молярной экстинкции, рассчитанный на основе аминокислотной последовательности согласно методу, который описан у Pace et al., Protein Science, 4, 1995, p. 2411-1423.

#### Определение концентрации антител в супернатантах.

Концентрацию антител и их производных в супернатантах клеточных культур определяли путем иммунопреципитации с белок А-агарозными гранулами (фирма Roche). 60 мкл белок А-агарозных гранул промывали трижды в TBS-NP40 (50 mM Трис, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40). Затем 1-15 мл супернатанта клеточной культуры наносили на белок А-агарозные гранулы, предварительно уравновешенные в TBS-NP40. После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре гранулы промывали на фильтрующей колонке типа Ultrafree-MC (фирма Amicon), используя однократно 0,5 мл TBS-NP40, дважды 0,5 мл двукратного (2×) забуференного фосфатом физиологического раствора (2×ЗФР, фирма Roche) и быстро четыре раза, используя 0,5 мл 100 mM Na-цитратного буфера, pH 5,0. Связанное антитело элюировали, добавляя 35 мкл буфера для образцов NuPAGE® LDS (фирма Invitrogen). Половину образца объединяли с восстановителем для образцов NuPAGE® или оставляли в невосстановленной форме соответственно и выдерживали в течение 10 мин при 70°C. Затем по 5-30 мкл применяли для осуществления ДСН-ПААГ с использованием 4-12% бис-Трис-гелей NuPAGE® (фирма Invitrogen) (применяя буфер MOPS для осуществления ДСН-ПААГ в невосстанавливающихся условиях и буфер MES в виде подвижного буфера с антиоксидантной добавкой NuPAGE® (фирма Invitrogen) для осуществления ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях) и окрашивали кумасси бриллиантовым голубым.

Концентрацию антител и их производных в супернатантах клеточных культур оценивали количественно с помощью аффинной ЖХВР-хроматографии. В целом, метод состоял в следующем: супернатанты клеточных культур, содержащие антитела и их производные, которые связывались с белком А, вносили на колонку Applied Biosystems Poros A/20 в 200 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100 mM цитрате натрия, pH 7,4 и элюировали из матрикса с помощью 200 mM NaCl, 100 mM лимонной кислоты, pH 2,5 с использованием системы Agilent HPLC 1100. Элюированный белок оценивали количественно с помощью измерения УФ-абсорбции и интегрирования площадей пиков. Очищенное стандартное антитело в виде IgG1 служило в качестве стандарта.

В альтернативном варианте концентрацию антител и их производных в супернатантах клеточных культур оценивали с помощью "сэндвич"-IgG-ELISA. В целом, метод состоял в следующем: 96-луночные титрационные микропланшеты, обладающие высокой способностью связывать стрептавидин А (планшеты типа StreptaWell High Bind Streptavidin A (фирма Roche)), сенсibiliзировали из расчета 100 мкл/лунку биотинилированным античеловеческим IgG F(ab')<sub>2</sub>-h-Fcγ>BI (фирма Dianova), применяемым в качестве иммобилизованной молекулы, в концентрации 0,1 мкг/мл в течение 1 ч при комнатной температуре или в другом варианте в течение ночи при 4°C и затем промывали трижды, используя 200 мкл/лунку ЗФР, 0,05% Твин (ЗФРТ, фирма Sigma). Добавляли в лунки по 100 мкл/лунку серийных разведений в ЗФР (фирма Sigma) супернатантов клеточных культур, содержащих соответствующее антитело, и инкубировали в течение 1-2 ч на шейкере для титрационных микропланшетов при комнатной температуре. Лунки промывали трижды, используя 200 мкл/лунку ЗФРТ, и выявляли связанное антитело с помощью 100 мкл F(ab')<sub>2</sub>-h-Fcγ>POD (фирма Dianova) в концентрации 0,1 мкг/мл в качестве идентифицирующего антитела в течение 1-2 ч на шейкере для титрационных микропланшетов при комнатной температуре. Несвязанное идентифицирующее антитело отмывали трижды, используя 200 мкл/лунку ЗФРТ, а связанное идентифицирующее антитело выявляли, добавляя 100 мкл АВТС/лунку. Определение абсорбции осуществляли на спектрометре типа Tecan Fluor при длине волны 405 нм (длина референс-волны 492 нм).

#### Очистка белков.

Белки очищали из профильтрованных супернатантов клеточных культур согласно стандартным протоколам. В целом, метод состоял в следующем: антитела вносили на колонку, заполненную белок А-сефарозой (фирма GE Healthcare), и промывали ЗФР. Элюцию антител осуществляли при pH 2,8 с последующей немедленной нейтрализацией образца. Агрегированный белок отделяли от мономерных антител гель-фильтрацией (Супердекс 200, фирма GE Healthcare) в ЗФР или в 20 mM гистидине, 150 mM NaCl, pH 6,0. Фракции мономерных антител объединяли, (при необходимости) концентрировали, используя, например, центрифужный концентратор типа MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO (молекулярно-весовой предел), замораживали и хранили при -20 или -80°C. Часть образцов оставляли для последующего аналитического изучения белка и его аналитической характеристики, например, с помощью

ДСН-ПААГ, гель-фильтрации (ГФ) или масс-спектрометрии.

ДСН-ПААГ.

Применяли гелевую систему NuPAGE® Pre-Cast (фирма Invitrogen) согласно инструкции производителя. В частности, использовали 10% или 4-12% бис-Трис Pre-Cast-гели NuPAGE®, Novex® (pH 6,4) и подвижные буферы, такие как NuPAGE® MES (гели, применяемые в восстанавливающих условиях, подвижный буфер с антиоксидантной добавкой NuPAGE®) или MOPS (гели, применяемые в невосстанавливающих условиях).

Аналитическая гель-фильтрация.

В качестве гель-фильтрации (ГФ), предназначенной для определения агрегированного и олигомерного состояния антител, применяли ЖХВР-хроматографию. В целом, метод состоял в следующем: очищенные на белке А антитела вносили на колонку типа Tosoh TSKgel G3000SW в 300 mM NaCl, 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,5 в системе Agilent HPLC 1100, или на колонку Супердекс 200 (фирма GE Healthcare) в 2×3ФР в ЖХВР-системе Dionex. Количество элюированного белка определяли на основе УФ-абсорбции и интегрирования площадей пиков. В качестве стандарта применяли стандарт для гель-фильтрации фирмы BioRad (Gel Filtration Standard 151-1901).

Масс-спектрометрия.

В этом разделе описана характеристика мультиспецифических антител с VH/VL-обменом (VH/VL-CrossMab), особое значение при осуществлении которой придавали их правильной сборке. Ожидаемые первичные структуры анализировали с помощью масс-спектрометрии с ионизацией электроспре-ем (ESI-МС) дегликозилированных интактных CrossMab и дегликозилированных/расщепленных плазмидом или в другом варианте дегликозилированных/ограниченно расщепленных LysC CrossMab.

VH/VL-CrossMab дегликозилировали с помощью N-гликозидазы F в фосфатном или Трис-буфере при 37°C в течение вплоть до 17 ч при концентрации белка 1 мг/мл. Расщепление плазмидом или ограниченное расщепление LysC (фирма Roche) осуществляли, используя 100 мкг дегликозилированных VH/VL-CrossMab в Трис-буфере, pH 8 при комнатной температуре в течение 120 ч и при 37°C в течение 40 мин соответственно. Перед осуществлением масс-спектрометрии образцы обессоливали с помощью ЖХВР на колонке Сефадекс G25 (фирма GE Healthcare). Общую массу определяли с помощью ESI-МС с использованием МС-системы maXis 4G UHR-QTOF, снабженной источником NanoMate TriVersa (фирма Advion).

Определение связывания или аффинности связывания мультиспецифических антител с соответствующими антигенами с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (BIAcore).

Связывание созданных антител с соответствующими антигенами (например, ANG2 и VEGF) изучали с помощью поверхностного плазмонного резонанса, применяя устройство BIAcore (фирма GE Healthcare Biosciences AB, Уппсала, Швеция). В целом, метод состоял в следующем: для оценки аффинности козьи античеловеческие антитела IgG-типа JIR 109-005-098 иммобилизовали на CM5-чипе посредством аминного сочетания для презентации антител к соответствующему антигену. Связывание измеряли в HBS-буфере (HBS-P (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005% Твин 20, pH 7,4) при 25°C (или в альтернативном варианте при 37°C). Добавляли антиген (фирма R&D Systems или очищенный в лаборатории заявителей) в различных концентрациях в растворе. Для измерения ассоциации инъекцию антигена осуществляли в течение промежутка времени, составляющего от 80 с до 3 мин; диссоциацию измеряли путем промывки поверхности чипа HBS-буфером в течение 3-10 мин и величину  $K_D$  определяли, используя модель связывания Ленгмюра при соотношении 1:1. Данные, полученные для отрицательного контроля (например, кривые, полученные для буфера), вычитали из кривых для образца для коррекции присущей системе сдвигу и для снижения шумового сигнала. Соответствующую программу BIAcore Evaluation применяли для анализа сенсограмм и для расчета данных об аффинности.

Пример 1А.

Производство и экспрессия мультиспецифических антител, которые связываются с ангиопоэтином-2 (ANG2) и VEGF, с обменом/заменой VH/VL-доменов (CrossMab<sup>VH-VL</sup>) в одном связывающем плече и с единичными заменами заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL.

В качестве первого примера создавали мультиспецифические антитела, которые связываются с человеческим ангиопоэтином-2 (ANG2) и человеческим VEGF, с помощью описанных в разделе "Общие методы" классических методик молекулярной биологии и кратковременно экспрессировали в HEK293-клетках согласно описанному выше методу. Общая схема указанных соответствующих мультиспецифических антител представлена на фиг. 1А, 1В. Для сравнения получали также антитела дикого типа (wt) с обменом/заменой VH/VL-доменов, но без замены в поверхности раздела CH1/CL. Кроме того, для сравнения использовали также другие альтернативные замены в непосредственной близости к поверхности раздела CH1/CL (упомянутые, например, в EP 2647707). Мультиспецифические антитела экспрессировали, используя экспрессионные плазмиды, содержащие нуклеиновые кислоты, которые кодируют аминокислотные последовательности, представленные в табл. 2а.

Таблица 2а. Аминокислотные последовательности легких цепей (LC) и тяжелых цепей (HC) мультиспецифических антител к Ang2-VEGF Ang2VEGF-0273, Ang2VEGF-0396, Ang2VEGF-0397, Ang2VEGF-0394, Ang2VEGF-0395 с обменом/заменой VH/VL-доменов (CrossMab<sup>VH-VL</sup>): дикого типа (wt) и с различными комбинациями единичных замен заряженных аминокислот

Антитело	LC ANG-2	HC ANG-2	HC VEGF	LC VEGF
Ang2VEGF-0273	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0396	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0397	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0394	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0395	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4

Для всех конструкций применяли технологию гетеродимеризации "knobs into holes" с типичной заменой, приводящей к образованию "выступа" (T366W) в первом CH3-домене, и соответствующими заменами, приводящими к образованию "впадины" (T366S, L368A и Y407V) во втором CH3-домене (а также интродукцию двух дополнительных остатков цистеина S354C/Y349C) (которые содержались в соответствующих последовательностях тяжелых цепей (HC), указанных выше).

Пример 1Б.

Очистка и характеристика мультиспецифических антител, которые связываются с ангиопоэтином-2 (ANG2) и VEGF, с обменом/заменой VH/VL-доменов (CrossMab<sup>VH-VL</sup>) в одном связывающем плече и с единичными заменами заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL.

Мультиспецифические антитела, экспрессия которых описана выше, очищали из супернатанта путем комбинации аффинной хроматографии на белке А и гель-фильтрации. Все мультиспецифические антитела можно получать с высокими выходами, и они являлись стабильными.

Полученные продукты характеризовали в отношении их идентичности с помощью масс-спектрометрии и определяли их аналитические свойства, такие как чистота, которую оценивали с помощью ДСН-ПААГ, содержание мономеров и стабильность.

Масс-спектрометрия.

Ожидаемые первичные структуры анализировали с помощью масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем (ESI-МС) дегликозилированных интактных CrossMab и дегликозилированных/расщепленных плазмином или в другом варианте дегликозилированных/ограниченно расщепленных LysC CrossMab.

VH/VL-CrossMab дегликозилировали с помощью N-гликозидазы F в фосфатном или Трис-буфере при 37°C в течение вплоть до 17 ч при концентрации белка 1 мг/мл. Расщепление плазмином или ограниченное расщепление LysC (фирма Roche) осуществляли, используя 100 мкг дегликозилированных VH/VL-CrossMab в Трис-буфере, pH 8 при комнатной температуре в течение 120 ч и при 37°C в течение 40 мин соответственно. Перед осуществлением масс-спектрометрии образцы обессоливали с помощью ЖХВР на колонке Сефадекс G25 (фирма GE Healthcare). Общую массу определяли с помощью ESI-МС с использованием МС-системы maXis 4G UHR-QTOF, снабженной источником NanoMate TriVersa (фирма Advion).

Результаты представлены в табл. 2б и на фиг. 4А.

Таблица 2б. Снижение содержания основного побочного продукта, полученного в результате бенс-джонсовского взаимодействия, путем единичных замен заряженных аминокислот, предлагаемых в изобретении, в поверхности раздела CH1/CL

	CL ANG-2 (положение 124)	CL ANG-2 (положение 123)	CH1 ANG-2 (положение 147)	CH1 ANG-2 (положение 213)	CH1 VEGF	CL VEGF	Основной побочный продукт (ошибочное спаривание бенс-джонсовского типа) % с помощью МС
Ang2VEGF-0273	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	Wt	~20
Ang2VEGF-0396	<b>Q124K</b>	Wt	<b>K147E</b>	wt	wt	Wt	~3
Ang2VEGF-0397	<b>Q124K</b>	Wt	wt	<b>K213E</b>	wt	Wt	~3
Ang2VEGF-0394	wt	<b>E123K</b>	<b>K147E</b>	wt	wt	Wt	~15
Ang2VEGF-0395	wt	<b>E123K</b>	wt	<b>K213E</b>	wt	Wt	~15

Результаты, представленные в табл. 2б и на фиг. 4А, свидетельствуют о том, что с помощью замен единичных заряженных аминокислот на аминокислоты с противоположным зарядом в CH1- и CL-доменах, предлагаемых в изобретении/указанных в настоящем описании (пара CL:Q124K и CH1:K147E или пара CL:Q124K и CH1:K213E), содержание основного побочного продукта (полученного в результате ошибочного спаривания бенс-джонсовского типа) значительно снижалось по сравнению с мультиспецифическим антителом дикого типа без указанных замен (снижение на ~ 17%). При использо-

вании других замен, находящихся в тесной близости от указанных (пара CL:Q123K и CH1:K147E или пара CL:Q123K CH1:K213E), обнаружено лишь небольшое снижение количества основного побочного продукта по сравнению с мультиспецифическим антителом дикого типа без указанных замен (снижение на ~5%).

Пример 1В.

Антигенсвязывающие свойства мультиспецифических антител, которые связываются с ангиопоэтином-2 (ANG2) и VEGF, с обменом/заменой VH/VL-доменов (CrossMAb<sup>VH-VL</sup>) в одном связывающем плече и с единичными заменами заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL

Связывание мультиспецифических антител, описанных выше в примерах 1А и 1Б, с соответствующими антигенами-мишеням, т.е. ANG2 и VEGF, оценивали с помощью BIAcore®.

Связывание с VEGF оценивали согласно следующей процедуре.

Связывание указанных антител с человеческим VEGFA-121 изучали с помощью поверхностного плазмонного резонанса, используя устройство BIAcore® T200 (фирма GE Healthcare). Примерно 10000 (RU) антитела к His (1 мкг/мл антитела к His; код заказа: 28995056; фирма GE Healthcare Bio-Sciences AB, Швеция) сшивали с CM5-чипом серий S (фирма GE Healthcare, BR-1005-30) при pH 5,0, применяя набор для аминного сочетания, поставляемый фирмой GE Healthcare. Буфер HBS-N (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4, фирма GE Healthcare) применяли в качестве подвижного буфера при осуществлении процедуры иммобилизации. При последующей характеристике кинетики буфер для образца и подвижный буфер представлял собой ЗФР-Т (10 mM забуференный фосфатом физиологический раствор, включающий 0,05% Твин 20), pH 7,4. Температуру проточной ячейки устанавливали на 25°C, а температуру блока для образца устанавливали на 12°C и примировали дважды, используя подвижный буфер, перед осуществлением характеристики кинетики.

VEFGA-121-His "захватывали" путем инъекции раствора с концентрацией 0,5 мкг/мл в течение 30 с при скорости потока 5 мкл/мин. Ассоциацию измеряли путем инъекции указанных антител в различных концентрациях в растворе в течение 180 с при скорости потока 30 мкл/мин, начиная с 1000 нМ, осуществляя серийные разведения 1:3. Мониторинг фазы диссоциации осуществляли в течение промежутка времени, составляющего вплоть до 600 с, и ее запускали путем замены раствора для образца на подвижный буфер. Поверхность регенерировали путем 60-секундной промывки с помощью раствора глицина, pH 1,5 при скорости потока 30 мкл/мин. Все различия в коэффициентах преломления корректировали путем вычитания ответа, полученного от поверхности, покрытой антителом к His. Вычитали также данные, полученные при осуществлении контрольных "пустых" инъекций (двойной контроль). Для расчета величины  $K_D$  и других кинетических параметров применяли модель 1:1 Лэнгмюра.

Связывание Ang-2 оценивали согласно следующей процедуре.

Связывание указанных антител с человеческим Ang-2-RBD-Fc изучали с помощью поверхностного плазмонного резонанса, используя устройство BIAcore® T200 (фирма GE Healthcare). Примерно 8000 (RU) козьего античеловеческого F(ab')<sub>2</sub> (10 мкг/мл античеловеческого F(ab')<sub>2</sub>; код заказа: 28958325; фирма GE Healthcare Bio-Sciences AB, Швеция) сшивали с CM5-чипом серий S (фирма GE Healthcare, BR-1005-30) при pH 5,0, применяя набор для аминного сочетания, поставляемый фирмой GE Healthcare. Буфер HBS-N (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4, фирма GE Healthcare) применяли в качестве подвижного буфера при осуществлении процедуры иммобилизации. При последующей характеристике кинетики буфер для образца и подвижный буфер представлял собой ЗФР-Т (10 mM забуференный фосфатом физиологический раствор, включающий 0,05% Твин 20), pH 7,4. Температуру проточной ячейки устанавливали на 25°C, а температуру блока для образца устанавливали на 12°C и примировали дважды, используя подвижный буфер, перед осуществлением характеристики кинетики.

Биспецифическое антитело "захватывали" путем инъекции раствора с концентрацией 5 нМ в течение 25 с при скорости потока 5 мкл/мин. Ассоциацию измеряли путем инъекции человеческого Ang2-RBD-Fc в различных концентрациях в растворе в течение 120 с при скорости потока 30 мкл/мин, начиная с 100 нМ, осуществляя серийные разведения 1:3. Мониторинг фазы диссоциации осуществляли в течение промежутка времени, составляющего вплоть до 180 с, и ее запускали путем замены раствора для образца на подвижный буфер. Поверхность регенерировали путем 60-секундной промывки с помощью раствора глицина, pH 2,1 при скорости потока 30 мкл/мин. Все различия в коэффициентах преломления корректировали путем вычитания ответа, полученного от поверхности, покрытой козьим античеловеческим F(ab')<sub>2</sub>. Вычитали также данные, полученные при осуществлении контрольных "пустых" инъекций (двойной контроль). Для расчета кажущейся величины  $K_D$  и других кинетических параметров применяли модель 1:1 Лэнгмюра.

В качестве применяемого для сравнения примера параллельно изучали контрольное антитело, специфически связывающееся с Ang2 и VEGF, которое содержало обмен/замену VH/VL-доменов, но в котором отсутствовали замены заряженных аминокислот (антитело Ang2VEGF-0273 в табл. 2б).

Результаты представлены в табл. 2в и 2г.

Таблица 2в. Аффинность к VEGF указанных антител

Образец	KD (нМ)
Ang2VEGF-0273	6
Ang2VEGF-0396	3
Ang2VEGF-0397	4
Ang2VEGF-0394	3
Ang2VEGF-0395	4

Таблица 2г. Аффинность к Ang2 указанных антител

Образец	KD (нМ)
Ang2VEGF-0273	15
Ang2VEGF-0396	17
Ang2VEGF-0397	14
Ang2VEGF-0394	12
Ang2VEGF-0395	15

Все протестированные антитела специфически связывались с обеими мишенями, т.е. Ang2 и VEGF, и величина их аффинности к антигену находилась в наномолярном диапазоне.

Пример 1Г.

Стабильность мультиспецифических антител, которые связываются с ангиопоэтином-2 (ANG2) и VEGF, с обменом/заменой VH/VL-доменов (CrossMAb<sup>VH-VL</sup>) в одном связывающем плече и с единичными заменами заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL.

Для оценки стабильности конструкций антител оценивали термостабильность, а также температуры начала агрегации согласно следующей процедуре.

Образцы указанных антител приготавливали в концентрации 1 мг/мл в 20 mM гистидине/хлориде гистидина, 140 mM NaCl, pH 6,0, переносили в набор 10-микролитровых кювет и фиксировали данные о статическом рассеянии света, а также данные о флуоресценции после возбуждения лазером при длине волны 266 нм с помощью устройства Optim1000 (фирма Avacsta Inc.), при этом температуру образцов повышали со скоростью 0,1°C/мин с 25 до 90°C.

Температуру начал агрегации ( $T_{agg}$ ) определяли как температуру, при которой начинает возрастать интенсивность рассеяния света. Температуру плавления ( $T_m$ ) определяли как точку излома на графике зависимости интенсивности флуоресценции от длины волны.

Результаты представлены в табл. 2д.

Таблица 2д. Температура начала агрегации ( $T_{agg}$ ) и температура плавления ( $T_m$ ) указанных антител

Образец	$T_{agg}$ (°C)	$T_m$ (°C)
Ang2VEGF-0273	56,0	61,3
Ang2VEGF-0396	56,9	62,0
Ang2VEGF-0397	56,0	61,7
Ang2VEGF-0394	56,9	62,2
Ang2VEGF-0395	56,8	62,1

Пример 1Д.

Выход производства мультиспецифических антител, которые связываются с ангиопоэтином-2 (ANG2) и VEGF, с обменом/заменой VH/VL-доменов (CrossMAb<sup>VH-VL</sup>) в одном связывающем плече и с единичными заменами заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL.

Выходы производства указанных мультиспецифических антител оценивали после очистки на белке А (ProtA). Результаты представлены в табл. 2е.

Таблица 2е. Выходы производства [мг/л супернатанта] указанных антител

Образец	ProtA
Ang2VEGF-0273	65
Ang2VEGF-0396	80,8
Ang2VEGF-0397	68,4
Ang2VEGF-0394	79,2
Ang2VEGF-0395	93,6

Пример 2А.

Производство и экспрессия мультиспецифических антител, которые связываются с ангиопоэтином-2 (ANG2) и VEGF, с обменом/заменой VH/VL-доменов (CrossMAb<sup>VH-VL</sup>) в одном связывающем плече и с различными заменами заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL.

В качестве первого примера создавали мультиспецифические антитела, которые связываются с человеческим ангиопоэтином-2 (ANG2) и человеческим VEGF, согласно классическим методикам молекулярной биологии, описанным в разделе "Общие методы", и кратковременно экспрессировали в HEK293-клетках согласно описанному выше методу. Общая схема указанных соответствующих мультиспецифических антител представлена на фиг. 1А, 1В. Для сравнения получали также антитела дикого типа (wt) с обменом/заменой VH/VL-доменов, но без замены в поверхности раздела CH1/CL. Мультиспецифические антитела экспрессировали, используя экспрессионные плазмиды, содержащие нуклеиновые кислоты, которые кодируют аминокислотные последовательности, представленные в табл. 3а.

Таблица 3а. Аминокислотные последовательности легких цепей (LC) и тяжелых цепей (HC) мультиспецифических антител к Ang2-VEGF Ang2VEGF-0273, Ang2VEGF-0274, Ang2VEGF-0282, Ang2VEGF-0283, Ang2VEGF-0284, Ang2VEGF-0285, Ang2VEGF-0286 с обменом/заменой VH/VL-доменов (CrossMAb<sup>VH-VL</sup>): дикого типа (wt) и с различными комбинациями замен заряженных аминокислот

Антитело	LC ANG-2	HC ANG-2	HC VEGF	LC VEGF
Ang2VEGF-0273	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0274	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0282	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 12
Ang2VEGF-0283	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0284	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0285	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 12
Ang2VEGF-0286	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 12

Для всех конструкций применяли технологию гетеродимеризации "knobs into holes" с типичной заменой, приводящей к образованию "выступа" (T366W) в первом CH3-домене и соответствующими заменами, приводящими к образованию "впадины" (T366S, L368A и Y407V) во втором CH3-домене (а также интродукцию двух дополнительных остатков цистеина S354C/Y349C) (которые содержались в соответствующих последовательностях тяжелых цепей (HC), указанных выше).

Пример 2Б.

Очистка и характеристика мультиспецифических антител, которые связываются с ангиопоэтином-2 (ANG2) и VEGF, с обменом/заменой VH/VL-доменов (CrossMAb<sup>VH-VL</sup>) в одном связывающем плече и с различными заменами заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL.

Мультиспецифические антитела, экспрессия которых описана выше, очищали из супернатанта путем комбинации аффинной хроматографии на белке А и гель-фильтрации. Все мультиспецифические антитела можно получать с высокими выходами, и они являлись стабильными.

Полученные продукты характеризовали в отношении их идентичности с помощью масс-спектрометрии и определяли их аналитические свойства, такие как чистота, которую оценивали с помощью ДСН-ПААГ, содержание мономеров и стабильность.

Масс-спектрометрия.

Ожидаемые первичные структуры анализировали с помощью масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем (ESI-МС) дегликозилированных интактных CrossMab и дегликозилированных/расщепленных плазмином или в другом варианте дегликозилированных/ограниченно расщепленных LysC CrossMab.

VH/VL-CrossMab дегликозилировали с помощью N-гликозидазы F в фосфатном или Трис-буфере при 37°C в течение вплоть до 17 ч при концентрации белка 1 мг/мл. Расщепление плазмином или ограниченное расщепление LysC (фирма Roche) осуществляли, используя 100 мкг дегликозилированных VH/VL-CrossMab в Трис-буфере, pH 8 при комнатной температуре в течение 120 ч и при 37°C в течение 40 мин соответственно. Перед осуществлением масс-спектрометрии образцы обессоливали с помощью ЖХВР на колонке Сефадек G25 (фирма GE Healthcare). Общую массу определяли с помощью ESI-МС с использованием МС-системы maXis 4G UHR-QTOF, снабженной источником NanoMate TriVersa (фирма Advion).

Результаты представлены в табл. 3б и на фиг. 5А.

Таблица 3б. Снижение содержания основного побочного продукта, полученного в результате бенс-джонсовского взаимодействия, путем единичных замен заряженных аминокислот, предлагаемых в изобретении, в поверхности раздела CH1/CL

	CL ANG-2	CL ANG-2	CH1 ANG-2	CH1 ANG-2	CH1 VEGF	CL VEGF	Основной побочный продукт (ошибочное спаривание бенс-джонсовского типа) % с помощью MC
Ang2VEGF-0273	wt: Q124 (каппа)	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	wt: Q124	<u>~20%</u>
Ang2VEGF-0274	<b>Q124K</b>	<b>E123K</b>	<b>K147E</b>	<b>K213E</b>	wt	Wt	0
Ang2VEGF-0282	<b>Q124R</b>	<b>E123K</b>	<b>K147E</b>	<b>K213E</b>	wt	<b>Q124E</b>	0
Ang2VEGF-0283	<b>E124K</b> (лямбда)	<b>E123K</b>	<b>K147E</b>	<b>K213E</b>	wt	wt:	0
Ang2VEGF-0284	<b>Q124R</b>	<b>E123K</b>	<b>K147E</b>	<b>K213D</b>	wt	Wt	0
Ang2VEGF-0285	<b>Q124R</b>	<b>E123K</b>	<b>K147E</b>	<b>K213D</b>	wt	<b>Q124E</b>	0
Ang2VEGF-0286	<b>Q124K</b>	<b>E123K</b>	<b>K147E</b>	<b>K213E</b>	wt	<b>Q124E</b>	0

Результаты, представленные в табл. 3б и на фиг. 5А, свидетельствуют о том, что с помощью двойных замен заряженных аминокислот на аминокислоты с противоположным зарядом в CH1- и CL-доменах, предлагаемых в изобретении/указанных в настоящем описании (CL:Q124K/E123K и CH1:K147E/K213E; CL:Q124R/E123K и CH1:K147E/K213E; CL:Q124R/E123K и CH1:K147E/K213D), основной побочный продукт (полученный в результате ошибочного спаривания бенс-джонсовского типа) полностью отсутствовал при сравнении с мультиспецифическим антителом дикого типа без указанных замен. Это не зависело от дополнительной единичной замены Q124E в CL-домеене другого связывающего плеча, которая не влияла ни на экспрессию, ни на профиль побочных продуктов.

Пример 2В.

Антигенсвязывающие свойства мультиспецифических антител, которые связываются с ангиопоэтином-2 (ANG2) и VEGF, с обменом/заменой VH/VL-доменов (CrossMAb<sup>VH-VL</sup>) в одном связывающем плече и с различными заменами заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL.

Связывание мультиспецифических антител, описанных выше в примерах 2А и 2Б, с соответствующими антигенами-мишенями, т.е. ANG2 и VEGF, оценивали с помощью BIAcore® согласно методу, изложенному в примере 1В.

В качестве применяемого для сравнения примера параллельно изучали контрольное антитело, специфически связывающееся с Ang2 и VEGF, которое содержало обмен/замену VH/VL-доменов, но в котором отсутствовали замены заряженных аминокислот (антитело Ang2VEGF-0273 в табл. 2б).

Результаты представлены в табл. 3в и 3г.

Таблица 3в. Аффинность к VEGF указанных антител

Образец	KD (нМ)
Ang2VEGF-0273	6
Ang2VEGF-0274	3
Ang2VEGF-0282	4
Ang2VEGF-0283	4
Ang2VEGF-0284	4
Ang2VEGF-0285	4
Ang2VEGF-0286	4

Таблица 3г. Аффинность к Ang2 указанных антител

Образец	KD (нМ)
Ang2VEGF-0273	15
Ang2VEGF-0274	17
Ang2VEGF-0282	14
Ang2VEGF-0283	15
Ang2VEGF-0284	13
Ang2VEGF-0285	14
Ang2VEGF-0286	12

Все протестированные антитела специфически связывались с обеими мишенями, т.е. Ang2 и VEGF, и величина их аффинности к антигену находилась в наномолярном диапазоне.

Пример 2Г.

Стабильность мультиспецифических антител, которые связываются с ангиопоэтином-2 (ANG2) и VEGF, с обменом/заменой VH/VL-доменов (CrossMAb<sup>VH-VL</sup>) в одном связывающем плече и с единичными заменами заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL.

Для оценки стабильности конструкций антител оценивали термостабильность, а также температуры начала агрегации согласно процедуре, изложенной в примере 1Г.

Результаты представлены в табл. 3д.

Таблица 3д. Температура начала агрегации ( $T_{agg}$ ) и температура плавления ( $T_m$ ) указанных антител

Образец	$T_{agg}$ (°C)	$T_m$ (°C)
Ang2VEGF-0273	56,0	61,3
Ang2VEGF-0274	53,5	58,9
Ang2VEGF-0282	56,9	61,4
Ang2VEGF-0283	56,3	61,0
Ang2VEGF-0284	56,3	61,1
Ang2VEGF-0285	56,3	61,1
Ang2VEGF-0286	56,3	61,6

Пример 3А.

Производство и экспрессия мультиспецифических антител, которые связываются с IL-17 и TWEAK, с обменом/заменой VH/VL-доменов (CrossMab<sup>VH-VL</sup>) в одном связывающем плече и с различными заменами заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL.

В качестве первого примера создавали мультиспецифические антитела, которые связываются с человеческим IL-17 и человеческим TWEAK, согласно классическим методикам молекулярной биологии, описанным в разделе "Общие методы", и кратковременно экспрессировали в НЕК293-клетках согласно описанному выше методу. Общая схема указанных соответствующих мультиспецифических антител представлена на фиг. 1А, 1В. Для сравнения получали также антитела дикого типа (wt) с обменом/заменой VH/VL-доменов, но без замены в поверхности раздела CH1/CL. Мультиспецифические антитела экспрессировали, используя экспрессионные плазмиды, содержащие нуклеиновые кислоты, которые кодируют аминокислотные последовательности, представленные в табл. 4а.

Таблица 4а. Аминокислотные последовательности легких цепей (XC) и тяжелых цепей (HC) мультиспецифических антител к TWEAK-IL-17, TweakIL-17-0096, TweakIL-17-0097, TweakIL-17-0098, TweakIL-17-0099, TweakIL 17-0100, TweakIL-17-0101 с обменом/заменой VH/VL-доменов (CrossMab<sup>VH-VL</sup>): дикого типа (wt) и с различными комбинациями замен заряженных аминокислот

Антитело	LC IL17	HC IL17	HC TWEAK	LC TWEAK
TweakIL17-0096	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
TweakIL17-0097	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 21
TweakIL17-0098	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
TweakIL17-0099	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 21
TweakIL17-0100	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 21
TweakIL17-0101	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18

Для всех конструкций применяли технологию гетеродимеризации "knobs into holes" с типичной заменой, приводящей к образованию "выступа" (T366W) в первом CH3-доме и соответствующими заменами, приводящими к образованию "впадины" (T366S, L368A и Y407V) во втором CH3-доме (а также интродукцию двух дополнительных остатков цистеина S354C/Y349C) (которые содержались в соответствующих последовательностях тяжелых цепей (HC), указанных выше).

Пример 3Б.

Очистка и характеристика мультиспецифических антител, которые связываются с IL-17 и TWEAK, с обменом/заменой VH/VL-доменов (CrossMab<sup>VH-VL</sup>) в одном связывающем плече и с различными заменами заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL.

Мультиспецифические антитела, экспрессия которых описана выше, очищали из супернатанта путем комбинации аффинной хроматографии на белке А и гель-фильтрации. Все мультиспецифические антитела можно получать с высокими выходами, и они являлись стабильными.

Полученные продукты характеризовали в отношении их идентичности с помощью масс-спектрометрии и определяли их аналитические свойства, такие как чистота, которую оценивали с помощью ДСН-ПААГ, содержание мономеров и стабильность.

Масс-спектрометрия.

Ожидаемые первичные структуры анализировали с помощью масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем (ESI-МС) дегликозилированных интактных CrossMab и дегликозилированных/расщепленных плазмином или в другом варианте дегликозилированных/ограниченно расщепленных LysC CrossMab.

VH/VL-CrossMab дегликозилировали с помощью N-гликозидазы F в фосфатном или Трис-буфере при 37°C в течение вплоть до 17 ч при концентрации белка 1 мг/мл. Расщепление плазмином или ограниченное расщепление LysC (фирма Roche) осуществляли, используя 100 мкг дегликозилированных VH/VL-CrossMab в Трис-буфере, pH 8 при комнатной температуре в течение 120 ч и при 37°C в течение 40 мин соответственно. Перед осуществлением масс-спектрометрии образцы обессоливали с помощью ЖХВР на колонке Сефадекс G25 (фирма GE Healthcare). Общую массу определяли с помощью ESI-МС с использованием МС-системы maXis 4G UHR-QTOF, снабженной источником NanoMate TriVersa (фирма

Advion).

Результаты представлены в табл. 4б и на фиг. 6А.

Таблица 4б. Снижение содержания основного побочного продукта, полученного в результате бенс-джонсовского взаимодействия, путем единичных замен заряженных аминокислот, предлагаемых в изобретении, в поверхности раздела СН1/CL

	CL IL17 (положение 124)	CL IL17 (положение 123)	СН1 IL17 (положение 147)	СН1 IL17 (положение 213)	СН1 TWEAK	CL TWEAK (положение 124)	Основной побочный продукт (ошибочное спаривание бенс- джонсовского типа) % с помощью МС
TweakIL17- 0096	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	wt: Q124	~20%
TweakIL17- 0097	<b>Q124K</b>	<b>E123R</b>	<b>K147E</b>	<b>K213E</b>	wt	<b>Q124E</b>	0
TweakIL17- 0098	<b>Q124K</b>	<b>E123R</b>	<b>K147E</b>	<b>K213D</b>	wt	wt	0
TweakIL17- 0099	<b>Q124K</b>	<b>E123R</b>	<b>K147E</b>	<b>K213D</b>	wt	<b>Q124E</b>	0
TweakIL17- 0100	<b>Q124K</b>	<b>E123K</b>	<b>K147E</b>	<b>K213E</b>	wt	<b>Q124E</b>	0
TweakIL17- 0101	<b>Q124K</b>	<b>E123K</b>	<b>K147E</b>	<b>K213E</b>	wt	wt	не определяли

Результаты, представленные в табл. 4б и на фиг. 6А, свидетельствуют о том, что с помощью двойных замен заряженных аминокислот на аминокислоты с противоположным зарядом в СН1- и CL-доменах, предлагаемых в изобретении/указанных в настоящем описании (CL:Q124K/E123R и СН1:K147E/K213E; CL:Q124K/E123R и СН1:K147E/K213D; CL:Q124K/E123K и СН1:K147E/K213E), основной побочный продукт (полученный в результате ошибочного спаривания бенс-джонсовского типа) полностью отсутствовал при сравнении с мультиспецифическим антителом дикого типа без указанных замен. Это не зависело от дополнительной единичной замены Q124E в CL-домеи другого связывающего плеча, которая не влияла ни на экспрессию, ни на профиль побочных продуктов.

Пример 4А.

Производство и экспрессия двухвалентных и трехвалентных мультиспецифических антител, которые связываются с Ang2 и VEGF, где антитела лишены Fc-фрагментов и включают обмен/замену VH/VL-доменов в одном связывающем плече и одну или несколько замен заряженных аминокислот в поверхности раздела СН1/CL.

В качестве дополнительного примера создавали мультиспецифические антитела, которые связываются с человеческим ANG2 и человеческим VEGF, с помощью описанных в разделе "Общие методы" классических методик молекулярной биологии и кратковременно экспрессировали в НЕК293-клетках согласно описанному выше методу. Созданные антитела имели в связывающем плече, специфично связывающемся с VEGF, Fab-фрагмент с обменом VH/VL-доменов и в другом связывающем плече, специфично связывающемся с Ang2, Fab-фрагмент без обмена доменов, при этом в мультиспецифическом антителе отсутствовал Fc-фрагмент. Таким образом, первую легкую цепь получали из антитела, которое специфически связывается с человеческим Ang2 и содержит в направлении от N-конца к С-концу домены VL-CL. Тяжелые цепи первого (анти-Ang2) и второго (анти-VEGF) антител связывали с помощью глицин-серинового пептидного линкера. В тяжелой цепи антитела, специфически связывающегося с VEGF, исходный вариабельный домен VH заменяли на вариабельный домен VL, полученный из антитела к VEGF. Таким образом, полипептид, содержащий тяжелые цепи антител к Ang2 и к VEGF, содержал в направлении от N-конца к С-концу домены VH(Ang2)-СН1(Ang2)-линкер-VL(VEGF)-СН1(VEGF). В легкой цепи, специфически связывающейся с человеческим VEGF, исходный вариабельный домен VL заменяли на вариабельный домен VH, полученный из антитела к VEGF. Таким образом, модифицированная легкая цепь антитела к EGF содержал в направлении от N-конца к С-концу домены VH-CL. Замены конкретных аминокислот в поверхности раздела СН1/CL представлены в табл. 5б.

В этом примере создавали мультиспецифические антитела, имеющие три основные структуры:

I) двухвалентное мультиспецифическое (биспецифическое) антитело к Ang2-VEGF формата CrossFabV<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>-(Fab) (общая структура представлена на фиг. 7Г);

II) трехвалентное мультиспецифическое (биспецифическое) антитело к Ang2-VEGF формата (CrossFabV<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)<sub>2</sub>-Fab (общая структура представлена на фиг. 8В (neu));

III) трехвалентное мультиспецифическое (биспецифическое) антитело к Ang2-VEGF формата (Fab)<sub>2</sub>-CrossFabV<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> (общая структура представлена на фиг. 8Г).

Для сравнения получали также антитела дикого типа (wt) с обменом/заменой VH/VL-доменов, но без замены в поверхности раздела СН1/CL. Мультиспецифические антитела экспрессировали, используя экспрессионные плазмиды, содержащие нуклеиновые кислоты, которые кодируют аминокислотные последовательности, представленные в табл. 5а.

Таблица 5а. Аминокислотные последовательности легких цепей (LC) и тяжелых цепей (HC) мультиспецифических антител к Ang2-VEGF с обменом/заменой VH/VL-доменов: дикого типа ("незаряженные") и с различными комбинациями замен заряженных аминокислот ("заряженные")

Антитело	LC Ang2	HC	LC VEGF
xFab-Fab<ANG2-VEGF>-незаряженное (Ang2VEGF-0452)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 4
xFab-Fab<ANG2-VEGF>-заряженное (Ang2VEGF-0447)	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 4
xFab <sub>2</sub> -Fab<ANG2-VEGF>-незаряженное (Ang2VEGF-0453)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 4
xFab <sub>2</sub> -Fab<ANG2-VEGF>-заряженное (Ang2VEGF-0448)	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 4
Fab2-xFab<ANG2-VEGF>-незаряженное	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 4
Fab2-xFab<ANG2-VEGF>-заряженное	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 4

Таблица 5б. Аминокислотные замены в поверхности раздела CH1/CL в антителах, предлагаемых в изобретении, которые указаны в табл. 5а

	Ang2				VEGF	
	CL (положение 124)	CL (положение 123)	CH1 (положение 147)	CH1 (положение 213)	CH1	CL (положение 124)
xFab-Fab<ANG2-VEGF>-незаряженное (Ang2VEGF-0452)	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	wt: Q124
xFab-Fab<ANG2-VEGF>-заряженное (Ang2VEGF-0447)	<b>Q124R</b>	<b>E123K</b>	<b>K147E</b>	<b>K123E</b>	wt	Wt
xFab <sub>2</sub> -Fab<ANG2-VEGF>-незаряженное (Ang2VEGF-0453)	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	wt: Q124
xFab <sub>2</sub> -Fab<ANG2-VEGF>-заряженное (Ang2VEGF-0448)	<b>Q124R</b>	<b>E123K</b>	<b>K147E</b>	<b>K123E</b>	wt	Wt
Fab2-xFab<ANG2-VEGF>-незаряженное	wt: <b>Q124</b>	wt: <b>E123</b>	wt: <b>K147</b>	wt: <b>K213</b>	wt	wt: Q124
Fab2-xFab<ANG2-VEGF>-заряженное	<b>Q124R</b>	<b>E123K</b>	<b>K147E</b>	<b>K123E</b>	wt	Wt

Пример 4Б.

Производство и экспрессия двухвалентных и трехвалентных мультиспецифических антител, которые связываются с Ang2 и VEGF, где антитела лишены Fc-фрагментов и включают обмен/замену VH/VL-доменов в одном связывающем плече и различные замены заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL.

Секретируемый белок очищали стандартными методами аффинной очистки.

Выходы производства после аффинной очистки и фракция молекулы антитела, определенная с помощью аналитической гель-фильтрации, представлены в табл. 5в.

Таблица 5в. Выход производства и фракция требуемого антитела после аффинной очистки

Антитело	Выход [мг/л]	Фракция [%] антитела, определенная с помощью аналитической ГФ
Ang2VEGF-0452	37,8	64,1
Ang2VEGF-0447	26,7	88,5
Ang2VEGF-0453	4,2	88,5
Ang2VEGF-0448	9,7	92,4

Масс-спектрометрия.

Ожидаемые первичные структуры анализировали с помощью масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем (ESI-МС) дегликозилированных интактных CrossMab и дегликозилированных/расщепленных плазмином или в другом варианте дегликозилированных/ограниченно расщепленных LysC CrossMab.

Конструкции VH/VL Fab-CrossFab дегликозилировали с помощью N-гликозидазы F в фосфатном или Трис-буфере при 37°C в течение вплоть до 17 ч при концентрации белка 1 мг/мл. Расщепление плазмином или ограниченное расщепление LysC (фирма Roche) осуществляли, используя 100 мкг дегликозилированных VH/VL-CrossMab в Трис-буфере, рН 8 при комнатной температуре в течение 120 ч и при 37°C в течение 40 мин соответственно. Перед осуществлением масс-спектрометрии образцы обессоливали с помощью ЖХВР на колонке Сефадекс G25 (фирма GE Healthcare). Общую массу определяли с по-

мощью ESI-МС с использованием МС-системы maXis 4G UHR-QTOF, снабженной источником NanoMate TriVersa (фирма Advion).

Из-за перекрытия диапазона масс представленного продукта и масс, полученных при создании методами МС, образцы оценивали с помощью двух различных методов для обнаружения потенциальных побочных продуктов в более высоком диапазоне масс. При работе в более высоком диапазоне масс (1000-4000 m/z) метод включал CID (светоизлучающий диод)-напряжение (в данном случае с CID 90), при измерении в более низком диапазоне масс (600-2000) не применяли CID. При применении CID повышался шанс получения фрагментов, которые появлялись в источнике фрагментации в масс-спектрометре.

Результаты представлены в табл. 5г.

Таблица 5г. Результаты количественной оценки побочных продуктов указанных антител по данным МС-анализа относительно требуемой основной молекулы

Антитело	Фракция побочных продуктов [%] по данным МС	Побочный продукт
Ang2VEGF-0452	6%	ошибочно спаренный побочный продукт с двумя легкими цепями VL-CL антитела к Ang2
Ang2VEGF-0447	0	не обнаружен
Ang2VEGF-0453	4,4%; 35,7%	ошибочно спаренный побочный продукт с тремя легкими цепями VL-CL антитела к Ang; ошибочно спаренный побочный продукт с двумя легкими цепями VL-CL антитела к Ang и одной цепью VH-CL антитела к VEGF
Ang2VEGF-0448	0	не обнаружен

Пример 4В.

Антигенсвязывающие свойства двухвалентных и трехвалентных мультиспецифических антител, которые связываются с ANG2 и VEGF, где антитела лишены Fc-фрагментов и включают обмен/замену VH/VL-доменов в одном связывающем плече и различные замены заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL.

Связывание мультиспецифических антител, описанных выше в примерах 4А и 4Б, с соответствующими антигенами-мишенями, т.е. ANG2 и VEGF, оценивали с помощью BIAcore®.

Связывание с VEGF оценивали согласно следующей процедуре.

Связывание указанных антител с человеческим VEGFA-121 изучали с помощью поверхностного плазмонного резонанса, используя устройство BIAcore® T200 (фирма GE Healthcare). Для этой цели 50 RU VEGFA-121-His сшивали с C1-чипом серии S (фирма GE Healthcare BR-1005-35) при pH 5,0, применяя набор для аминного сочетания, поставляемый фирмой GE Healthcare. Буфер HBS-N (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4, фирма GE Healthcare) применяли в качестве подвижного буфера при осуществлении процедуры иммобилизации. При последующей характеристике кинетики буфер для образца и подвижный буфер представлял собой ЗФР-Т (10 mM забуференный фосфатом физиологический раствор, включающий 0,05% Твин 20), pH 7,4. Температуру проточной ячейки устанавливали на 25°C, а температуру блока для образца устанавливали на 12°C и примирировали дважды, используя подвижный буфер, перед осуществлением характеристики кинетики.

Ассоциацию измеряли путем инъекции указанных антител в различных концентрациях в растворе в течение 180 с при скорости потока 30 мкл/мин, начиная с 100 нМ, осуществляя серийные разведения 1:3. Мониторинг фазы диссоциации осуществляли в течение промежутка времени, составляющего вплоть до 300 с, и ее запускали путем замены раствора образца на подвижный буфер. Поверхность регенерировали путем 60-секундной промывки с помощью 0,85% раствора H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (фосфорная кислота) при скорости потока 30 мкл/мин. Все различия в коэффициентах преломления корректировали путем вычитания ответа, полученного от поверхности, покрытой антителом к His. Вычитали также данные, полученные при осуществлении контрольных "пустых" инъекций (двойной контроль). Для расчета величины K<sub>D</sub> и других кинетических параметров применяли модель 1:1 Лэнгмюра.

Связывание Ang-2 оценивали согласно следующей процедуре.

Связывание указанных антител с человеческим Ang-2-RBD-Fc изучали с помощью поверхностного плазмонного резонанса, используя устройство BIAcore® T200 (фирма GE Healthcare). Примерно 8000 (RU) козьего античеловеческого F(ab')<sub>2</sub> (10 мкг/мл античеловеческого F(ab')<sub>2</sub>; код заказа: 28958325; фирма GE Healthcare Bio-Sciences AB, Швеция) сшивали с CM5-чипом серий S (фирма GE Healthcare, BR-1005-30) при pH 5,0, применяя набор для аминного сочетания, поставляемый фирмой GE Healthcare. Буфер HBS-N (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4, фирма GE Healthcare) применяли в качестве подвижного буфера при осуществлении процедуры иммобилизации. При последующей характеристике кинетики буфер для образца и подвижный буфер представлял собой ЗФР-Т (10 mM забуференный фосфатом физиологический раствор, включающий 0,05% Твин 20), pH 7,4. Температуру проточной ячейки уста-

навливали на 25°C, а температуру блока для образца устанавливали на 12°C и примировали дважды, используя подвижный буфер перед осуществлением характеристики кинетики.

Биспецифическое антитело "захватывали" путем инъекции раствора с концентрацией 5 нМ в течение 25 с при скорости потока 5 мкл/мин. Ассоциацию измеряли путем инъекции человеческого Ang2-RBD-Fc в различных концентрациях в растворе в течение 120 с при скорости потока 30 мкл/мин, начиная с 100 нМ, осуществляя серийные разведения 1:3. Мониторинг фазы диссоциации осуществляли в течение промежутка времени, составляющего вплоть до 180 с, и ее запускали путем замены раствора образца на подвижный буфер. Поверхность регенерировали путем 60-секундной промывки с помощью раствора глицина, рН 2,1 при скорости потока 30 мкл/мин. Все различия в коэффициентах преломления корректировали путем вычитания ответа, полученного от поверхности, покрытой козьим античеловеческим F(ab')<sub>2</sub>. Вычитали также данные, полученные при осуществлении контрольных "пустых" инъекций (двойной контроль). Для расчета кажущейся величины K<sub>D</sub> и других кинетических параметров применяли модель 1:1 Лэнгмюра.

Результаты представлены в табл. 5д и 5е.

Таблица 5д. Аффинность к VEGF указанных антител

Антитело	KD (нМ)
Ang2VEGF-0452	0,35
Ang2VEGF-0447	0,36
Ang2VEGF-0453	0,22
Ang2VEGF-0448	0,18

Таблица 5е. Аффинность к Ang2 указанных антител

Антитело	KD (нМ)
Ang2VEGF-0452	3
Ang2VEGF-0447	3
Ang2VEGF-0453	5
Ang2VEGF-0448	4

Связывание с антигеном не нарушалось мутациями, интродуцированными в поверхность раздела CH1/CL антител, у которых отсутствует Fc.

Пример 5А.

Производство и экспрессия мультиспецифических антител, которые связываются с ангиопоэтином-2 (ANG2) и VEGF с обменом/заменой VH/VL-доменов (CrossMAb<sup>VH-VL</sup>) в VEGF-связывающем плече и с различными заменами заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL в VEGF-связывающем плече.

В качестве дополнительного примера создавали мультиспецифические антитела, которые связываются с человеческим ангиопоэтином-2 (ANG2) и человеческим VEGF, с помощью описанных в разделе "Общие методы" классических методик молекулярной биологии и кратковременно экспрессировали в HEK293-клетках согласно описанному выше методу. Общая схема указанных соответствующих мультиспецифических антител представлена на фиг. 1Б, на которой продемонстрировано, что замена различных заряженных аминокислот присутствует в поверхности раздела CH1/CL связывающего плеча, которое содержит обмен/замену VH/VL-доменов. Для сравнения получали также антитела дикого типа (wt) с обменом/заменой VH/VL-доменов, но без замены в поверхности раздела CH1/CL. Мультиспецифические антитела экспрессировали, используя экспрессионные плазмиды, содержащие нуклеиновые кислоты, которые кодируют аминокислотные последовательности, представленные в табл. 6а.

Таблица 6а. Аминокислотные последовательности легких цепей (LC) и тяжелых цепей (HC) мультиспецифических антител к Ang2-VEGF Ang2VEGF-0273, Ang2VEGF-0425 и Ang2VEGF-0424 с обменом/заменой VH/VL-доменов (CrossMAb<sup>VH-VL</sup>): дикого типа (wt) и с различными комбинациями замен заряженных аминокислот

Антитело	LC ANG-2	HC ANG-2	HC VEGF	LC VEGF
Ang2VEGF-0273	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0425	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 45
Ang2VEGF-0424	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 47

Для всех конструкций применяли технологию гетеродимеризации "knobs into holes" с типичной заменой, приводящей к образованию "выступа" (T366W) в первом CH3-доме и соответствующими заменами, приводящими к образованию "впадины" (T366S, L368A и Y407V) во втором CH3-доме (а также интродукцию двух дополнительных остатков цистеина S354C/Y349C) (которые содержались в соответствующих последовательностях тяжелых цепей (HC), указанных выше).

Пример 5Б.

Очистка и характеристика мультиспецифических антител, которые связываются с ангиопоэтином-2 (ANG2) и VEGF с обменом/заменой VH/VL-доменов (CrossMAb<sup>VH-VL</sup>) в одном связывающем плече и с различными заменами заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL.

Мультиспецифические антитела, экспрессия которых описана выше, очищали из супернатанта путем комбинации аффинной хроматографии на белке А и гель-фильтрации. Все мультиспецифические

антитела можно получать с высокими выходами, и они являлись стабильными.

Полученные продукты характеризовали в отношении их идентичности с помощью масс-спектрометрии и определяли их аналитические свойства, такие как чистота, которую оценивали с помощью ДСН-ПААГ, содержание мономеров и стабильность.

Масс-спектрометрия.

Ожидаемые первичные структуры анализировали с помощью масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем (ESI-МС) дегликозилированных интактных CrossMab и дегликозилированных/расщепленных плазмином или в другом варианте дегликозилированных/ограниченно расщепленных LysC CrossMab.

VH/VL-CrossMab дегликозилировали с помощью N-гликозидазы F в фосфатном или Трис-буфере при 37°C в течение вплоть до 17 ч при концентрации белка 1 мг/мл. Расщепление плазмином или ограниченное расщепление LysC (фирма Roche) осуществляли, используя 100 мкг дегликозилированных VH/VL-CrossMab в Трис-буфере, pH 8 при комнатной температуре в течение 120 ч и при 37°C в течение 40 мин соответственно. Перед осуществлением масс-спектрометрии образцы обессоливали с помощью ЖХВР на колонке Сефадекс G25 (фирма GE Healthcare). Общую массу определяли с помощью ESI-МС с использованием МС-системы maXis 4G UHR-QTOF, снабженной источником NanoMate TriVersa (фирма Advion).

Результаты представлены в табл. 6б.

Таблица 6б. Профиль побочного продукта, полученного (в результате бенс-джонсовского взаимодействия) путем единичных замен заряженных аминокислот в поверхности раздела СН1/CL в связывающем плече, которое содержит обмен/замену VH/VL-доменов

	CL ANG-2	СН1 ANG-2	СН1 VEGF	CL VEGF	Требуемая молекула	Основной побочный продукт (ошибочное спаривание бенс- джонсовского типа) % с помощью МС
Ang2VEGF-0273	wt (каппа)	wt	wt K147 K213	wt E123 Q124	<i>n.d.</i>	~20%
Ang2VEGF-0425	wt	wt	K147E	Q124K	72%	22%
Ang2VEGF-0424	wt	wt	K147E K213E	E123K Q124K	64%	26%

Результаты, представленные в табл. 6б, продемонстрировали, что профиль побочного продукта (включая продукт, полученный в результате ошибочного спаривания бенс-джонсовского типа) не удалось улучшить для биспецифических антител к Ang2-VEGF с аминокислотными заменами в поверхности раздела СН1/CL, локализованными в связывающем плече, которое содержит обмен/замену VH/VL-доменов.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения мультиспецифического антитела, включающий стадии, на которых:

А) трансформируют клетку-хозяина векторами, которые содержат молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела, которое специфически связывается с первым антигеном; и

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном и в котором переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг на друга; и

в котором:

I) в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) и в котором в константном домене СН1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота); или

II) в константном домене CL второй легкой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) и в котором в константном домене СН1 второй тяжелой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота);

Б) культивируют клетку-хозяина в условиях, обеспечивающих синтез указанной молекулы антитела; и

В) выделяют указанную молекулу антитела из указанной культуральной среды.

2. Способ по п.1, где в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), ами-

нокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (К) или аргинин (R).

3. Способ по п.1, где в константном домене CL второй легкой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (К) или аргинин (R).

4. Способ по п.1, в котором у указанной молекулы антитела в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (К) или аргинин (R) (нумерация согласно Кэботу), и в котором в константном домене СН1 первой тяжелой цепи, указанной в (а), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

5. Способ по п.1 или 4, в котором у указанной молекулы антитела в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (К), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) и в котором в константном домене СН1 первой тяжелой цепи, указанной в (а), аминокислота в положении 147 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

6. Способ по п.4, в котором у указанной молекулы антитела в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (К), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте независимо на лизин (К) или аргинин (R)) и дополнительно аминокислота в положении 123 заменена независимо на лизин (К), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) и в котором в константном домене СН1 первой тяжелой цепи, указанной в (а), аминокислота в положении 147 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) и аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

7. Способ по п.1, в котором у указанной молекулы антитела в константном домене CL второй легкой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (К), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте независимо на лизин (К) или аргинин (R)) и в котором в константном домене СН1 второй тяжелой цепи, указанной в (б), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

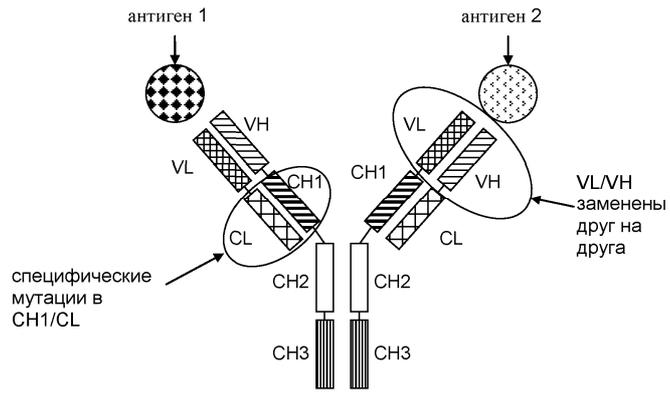
8. Способ по п.4, в котором в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена на лизин (К) (нумерация согласно Кэботу) и дополнительно аминокислота в положении 123 заменена на лизин (К) (нумерация согласно Кэботу) и в котором в константном домене СН1 первой тяжелой цепи, указанной в (а), аминокислота в положении 147 заменена на глутаминовую кислоту (E) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) и аминокислота в положении 213 заменена на глутаминовую кислоту (E) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

9. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что для стимулирования формирования мультиспецифического антитела в СН3 домене одной тяжелой цепи, который соприкасается в процессе формирования антитела с СН3 доменом другой тяжелой цепи, аминокислотный остаток, имеющий меньшую по объему боковую цепь, выбранный из группы, состоящей из аланина (A), серина (S), треонина (T) и валина (V), заменяют на аминокислотный остаток, который имеет большую по объему боковую цепь, выбранный из группы, включающей аргинин (R), фенилаланин (F), тирозин (Y) и триптофан (W), с образованием выпуклости на поверхности СН3-домена одной тяжелой цепи, которая может помещаться в полость на поверхности СН3 домена другой тяжелой цепи, а в СН3 домене другой тяжелой цепи, который соприкасается в процессе формирования антитела с СН3 доменом одной указанной выше тяжелой цепи, аминокислотный остаток, имеющий большую по объему боковую цепь, выбранный из группы, включающей аргинин (R), фенилаланин (F), тирозин (Y) и триптофан (W), заменяют на аминокислотный остаток, который имеет меньшую по объему боковую цепь, выбранный из группы, состоящей из аланина (A), серина (S), треонина (T) и валина (V), с образованием полости на поверхности раздела СН3-домена другой тяжелой цепи, в которую может помещаться выпуклость на поверхности раздела СН3-одной тяжелой цепи.

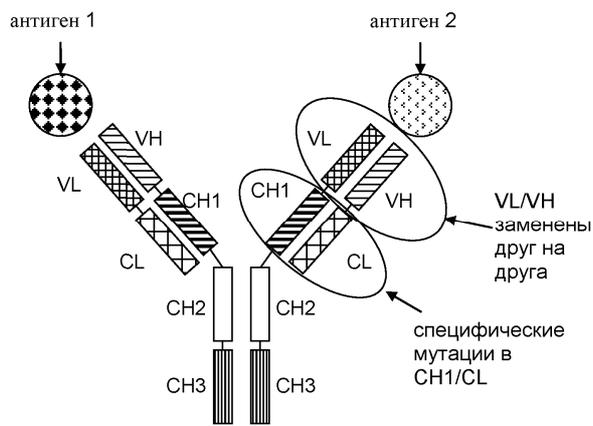
10. Способ по п.8, отличающийся тем, что оба СН3-домена дополнительно изменены путем интродукции цистеина (C) в качестве аминокислоты в соответствующие положения каждого СН3-домена таким образом, чтобы мог образоваться дисульфидный мостик между обоими СН3-доменами.

11. Экспрессионный вектор, содержащий молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотные последовательности легких и тяжелых цепей мультиспецифического антитела, охарактеризованного в пп.1-10, который обладает способностью экспрессировать указанную нуклеиновую кислоту в клетке-хозяине.

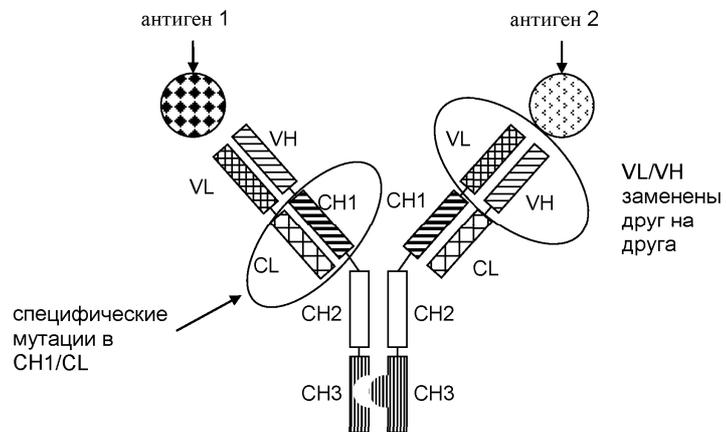
12. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело, полученное способом по одному из пп.1-10, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.



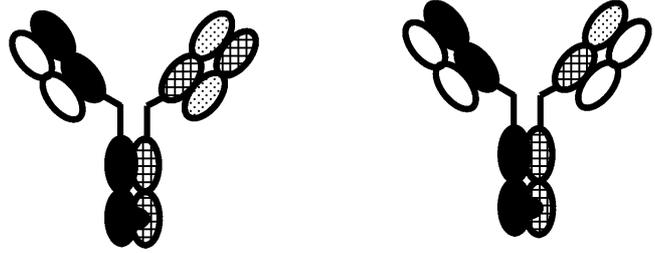
Фиг. 1А



Фиг. 1Б

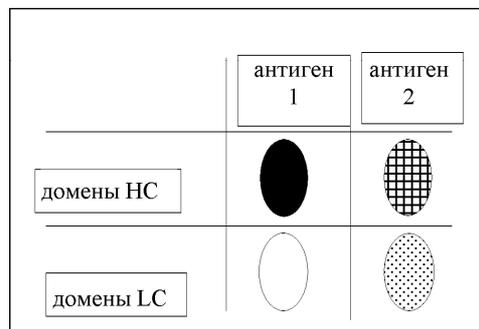


Фиг. 1В

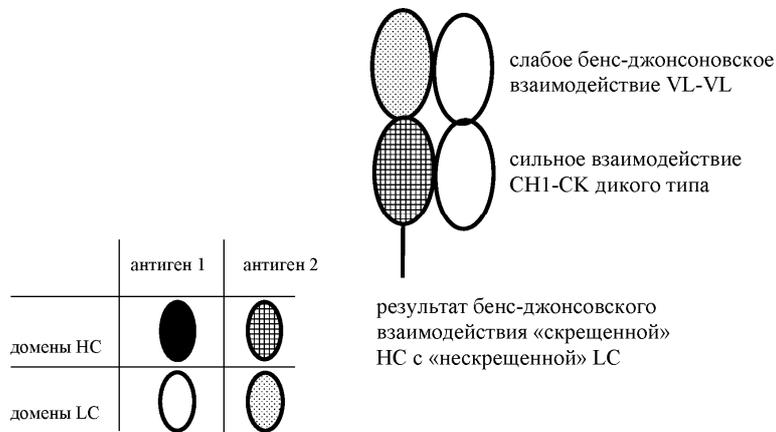


требуемое биспецифическое антитело с обменом/заменой VH-VL в одном из связывающих плечей

основной побочный продукт: результат бенс-джонсовского взаимодействия «скрещенной» HC с «нескрещенной» LC



Фиг. 2А



Фиг. 2Б



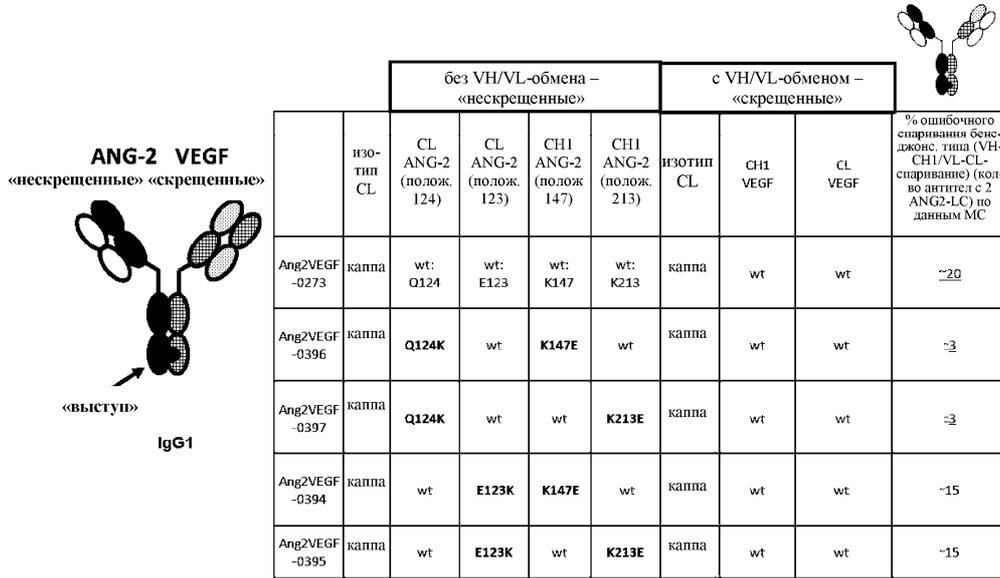
Фиг. 3А



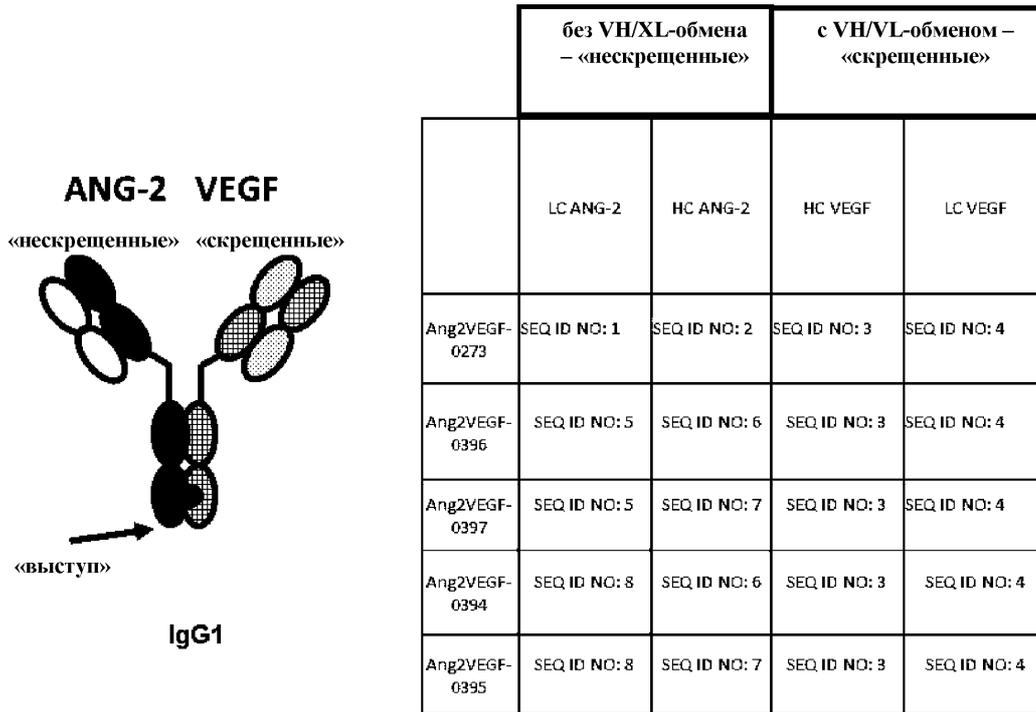
Фиг. 3Б

123 124  
 ↓ ↓  
 CL-лямбда wt: QPKAAPSVTLFPPSSKELQANKATLVCLISDPYFGAVKVAIKADGSPVMTGVEITTTFSKQSNMKYAASSYLSTPEQWFKSHRSYSQCQVTHEGSTVEKTVAPAECS

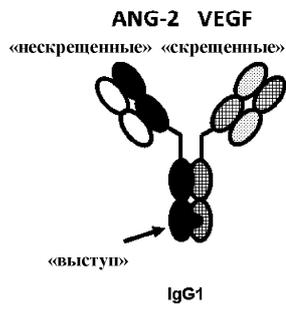
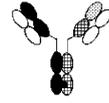
Фиг. 3В



Фиг. 4А



Фиг. 4Б



	без VH/VL-обмена – «нескращенные»				с VH/VL-обменом – «скращенные»			% ошибочного спаривания бес-диск-типа (VL/CH1/VL-CL-спаривание) (кол-во антигена с 2Ang2-LC) по данным МС	
	изотип CL	CL ANG-2	CL ANG-2	CH1 ANG-2	CH1 ANG-2	изотип CL	CH1 VEGF		CL VEGF
Ang2VEGF-0273	каппа	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	каппа	wt	wt: Q124	~20%
Ang2VEGF-0274	каппа	Q124K	E123K	K147E	K213E	каппа	wt	wt	0
Ang2VEGF-0282	каппа	Q124R	E123K	K147E	K213E	каппа	wt	Q124E	0
Ang2VEGF-0283	лямбда (лямбда wt E124/ E123)	E124K	E123K	K147E	K213E	каппа	wt	wt:	0
Ang2VEGF-0284	каппа	Q124R	E123K	K147E	K213D	каппа	wt	wt	0
Ang2VEGF-0285	каппа	Q124R	E123K	K147E	K213D	каппа	wt	Q124E	0
Ang2VEGF-0286	каппа	Q124K	E123K	K147E	K213E	каппа	wt	Q124E	0

Фиг. 5А



	без VH/VL-обмена – «нескращенные»		с VH/VL-обменом – «скращенные»	
	LC ANG-2	HC ANG-2	HC VEGF	LC VEGF
Ang2VEGF-0273	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0274	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0282	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 12
Ang2VEGF-0283	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0284	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0285	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 12
Ang2VEGF-0286	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 12

Фиг. 5Б

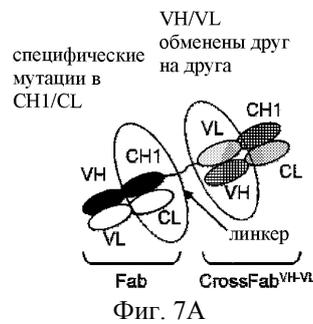


	изотип CL	без VH/VL-обмена – «нескрещенные»				с VH/VL-обменом – «скрещенные»			% ошибочного спаривания бенс-дконс. типа (VL-VL/VL-CL-спаривание) (кол-во антигел с2 IL17-LC) по данным МС
		CL IL17 (полож. 124)	CL IL17 (полож. 123)	CH1 IL17 (полож. 147)	CH1 IL17 (полож. 213)	изотип CL	CH1 TWEAK	CL TWEAK (полож. 124)	
TweakIL17-0096	каппа	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	каппа	wt	wt: Q124	~20%
TweakIL17-0097	каппа	Q124K	E123R	K147E	K213E	каппа	wt	Q124E	0
TweakIL17-0098	каппа	Q124K	E123R	K147E	K213D	каппа	wt	wt	0
TweakIL17-0099	каппа	Q124K	E123R	K147E	K213D	каппа	wt	Q124E	0
TweakIL17-0100	каппа	Q124K	E123K	K147E	K213E	каппа	wt	Q124E	0
TweakIL17-0101	каппа	Q124K	E123K	K147E	K213E	каппа	wt	wt	не опред.

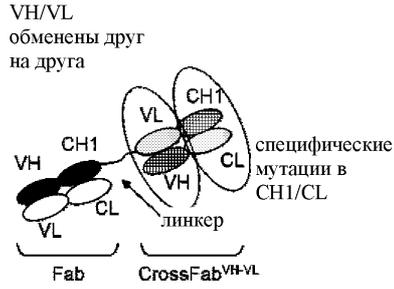
Фиг. 6А

	без VH/VL-обмена «нескрещенные»		с VH/VL-обменом – «скрещенные»	
	LC IL17	HC IL17	HC Tweak	LC Tweak
TweakIL17-0096	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
TweakIL17-0097	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 21
TweakIL17-0098	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
TweakIL17-0099	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 21
TweakIL17-0100	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 21
TweakIL17-0101	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18

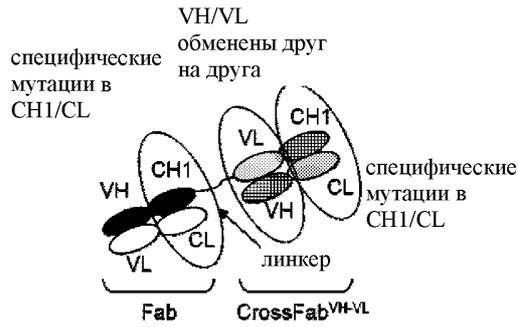
Фиг. 6Б



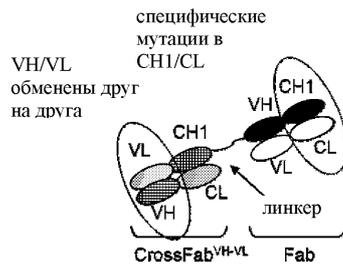
Фиг. 7А



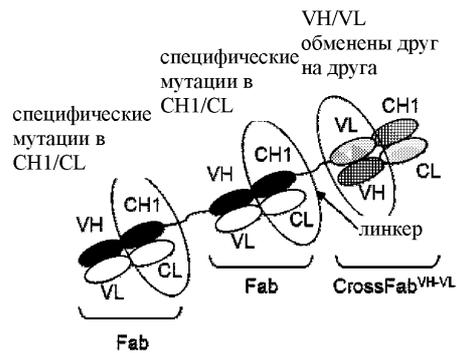
Фиг. 7Б



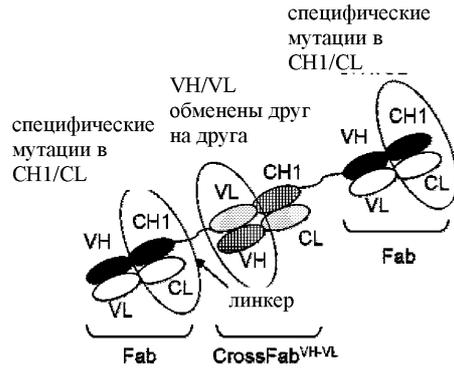
Фиг. 7В



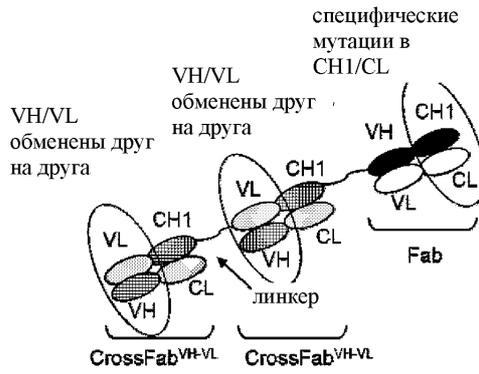
Фиг. 7Г



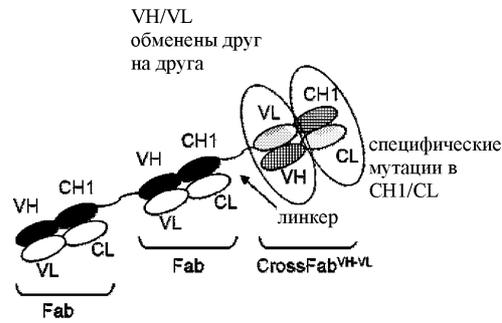
Фиг. 8А



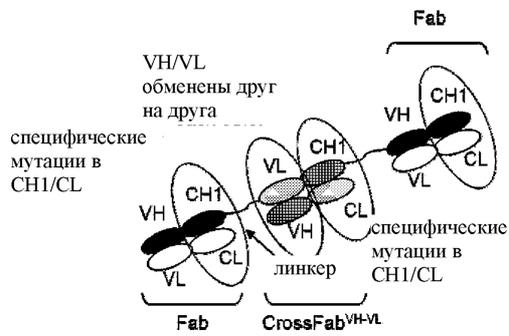
Фиг. 8Б



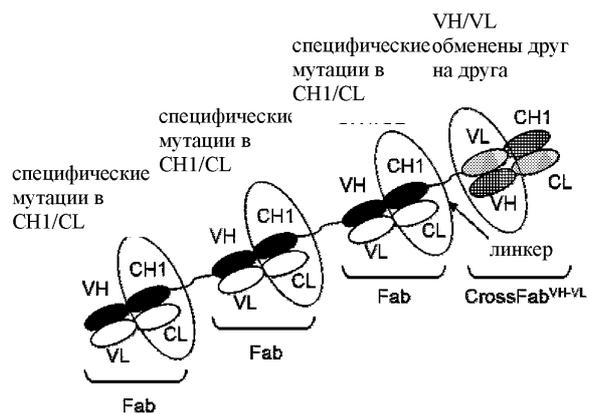
Фиг. 8В



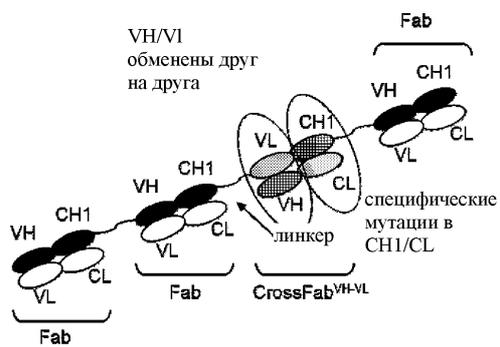
Фиг. 8Г



Фиг. 8Е



Фиг. 9А



Фиг. 9Б