

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202091053** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2020.12.03**

(51) Int. Cl. *C07K 16/46* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*C12N 5/10* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2019.01.15**

---

(54) **МОДИФИЦИРОВАННЫЕ С<sub>к</sub>- И С<sub>Н1</sub>-ДОМЕНЫ**

---

(31) **PCT/CN2018/072564**

(72) Изобретатель:

(32) **2018.01.15**

**Ван Юнцян, Фан Лэй, Ван Чжэньи,  
Го Бинши, Цзан Цзинъю (CN)**

(33) **CN**

(86) **PCT/CN2019/071740**

(74) Представитель:

(87) **WO 2019/137552 2019.07.18**

**Нилова М.И. (RU)**

(71) Заявитель:

**АЙ-МАБ БИОФАРМА ЮЭС  
ЛИМИТЕД (US)**

---

(57) Предложены антитело и антигенсвязывающий фрагмент с модифицированными С<sub>к</sub>- и С<sub>Н1</sub>-доменами, которые по-прежнему обеспечивают спаривание С<sub>к</sub>- и С<sub>Н1</sub>-доменов, но демонстрируют уменьшение спаривания по сравнению с С<sub>Н1</sub>- и С<sub>к</sub>-доменами дикого типа, не содержащими модификации. Такие модификации являются особенно подходящими для получения биспецифических антител, содержащих две различные пары С<sub>к</sub>- и С<sub>Н1</sub>-доменов.

---

**A1**

**202091053**

**202091053**

**A1**

## МОДИФИЦИРОВАННЫЕ С<sub>к</sub>- И С<sub>H1</sub>-ДОМЕНЫ

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

**[0001]** Биспецифическое моноклональное антитело (BsMAb, BsAb) представляет собой искусственный белок, который может одновременно связываться с двумя различными типами антигена или двумя различными эпитопами одного антигена. BsAb могут быть получены в нескольких структурных форматах, и в настоящее время исследуют возможности их применения для иммунотерапии рака и доставки лекарственных средств.

**[0002]** Существует множество форматов BsAb. IgG-подобное BsAb сохраняет традиционную структуру моноклонального антитела (mAb), состоящую из двух Fab-фрагментов и одной Fc-области, за исключением того, что указанные два Fab-центра связывают разные антигены. Самые распространенные типы называются трифункциональными антителами, поскольку они содержат три уникальных центра связывания на антителе: две Fab-области и Fc-область. Каждая пара тяжелой и легкой цепи получена из уникального mAb. Fc-область, полученная из двух тяжелых цепей, формирует третий центр связывания. Эти BsAb часто получают методом квадромы или межвидовой гибридомы.

**[0003]** Однако метод квадромы основан на случайной вероятности образования подходящих для применения BsAb и может быть неэффективным. Другой способ получения IgG-подобных BsAb называется «выступы-во-впадины» и основан на введении мутации для крупной аминокислоты в тяжелой цепи одного mAb и мутации для малой аминокислоты в тяжелой цепи другого mAb. Это позволяет тяжелым цепям-мишеням (и их соответствующим легким цепям) лучше совмещаться друг с другом и повышает надежность получения BsAb.

**[0004]** Хотя этот подход «выступы-во-впадины» решает проблему гомодимеризации тяжелых цепей, он не решает проблем, связанных с ошибочным спариванием между легкими цепями и тяжелыми цепями двух различных антител. Существует необходимость в разработке более подходящих BsAb, которые легче получать и которые обладают большей клинической стабильностью и эффективностью.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0005]** Согласно настоящему изобретению предложены антитела и антигенсвязывающие фрагменты с модифицированными С<sub>к</sub>- и С<sub>H1</sub>-доменами, которые по-прежнему обеспечивают спаривание С<sub>к</sub>- и С<sub>H1</sub>-доменов, но демонстрируют уменьшение

спаривания с СН1- и Ск-доменами, не содержащими модификаций. Такие модификации могут особенно подходить для получения биспецифических антител, содержащих две различные пары Ск- и СН1-доменов.

**[0006]** Как показано в примерах экспериментов, определяли, что две группы аминокислот имеют важное значение в качестве остатков на интерфейсе, которые при изменении могут уменьшать или даже нарушать спаривание Ск- и СН1-доменов, если не осуществлены соответствующие модификации для восстановления такого интерфейса.

**[0007]** Одна из таких групп включает Val26 (нумерация согласно Кабату: Val133) и Phe11 (нумерация согласно Кабату: Phe118) Ск-домена и Leu11 (нумерация согласно Кабату: Leu124) СН1-домена. Когда одну из этих аминокислот заменяют на Ala, например, спаривание Ск/СН1 может быть нарушено. Другая группа примеров включает Gln17 (нумерация согласно Кабату: 124) из Ск и Phe9 (нумерация согласно Кабату: 122) из СН1.

**[0008]** Однако некоторые мутации в этих остатках на интерфейсе могут восстанавливать спаривание, что также показано в примерах. Одним из таких примеров является Val26Trp (Ск) с Leu11Trp (СН1). Другие примеры представлены в таблице 1 и таблице 2.

**[0009]** В одном из вариантов реализации предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий СН1-фрагмент человека, содержащий замену L11W, и Ск-фрагмент человека, содержащий замену V26W. Такое антитело или фрагмент может необязательно содержать дополнительные замены, которые дополнительно уменьшают связывание с партнером дикого типа и/или усиливают связывание между фрагментами, содержащими замены.

**[0010]** Например, дополнительная пара замен может представлять собой K101E в СН1 и D15K или D15H (D15K/H) в Ск. Другая пара замен представляет собой K96D в СН1 и E16R в Ск. Другая пара замен представляет собой K96E в СН1 и E16K в Ск. Соответственно, в некоторых вариантах реализации предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором СН1-фрагмент содержит замены L11W и K101E, и Ск-фрагмент содержит замены V26W и D15K/H; СН1-фрагмент содержит замены L11W и K96D, и Ск-фрагмент содержит замены V26W и E16R; СН1-фрагмент содержит замены L11W и K96E, и Ск-фрагмент содержит замены V26W и E16K; или СН1-фрагмент содержит замены L11W и K96E, и Ск-фрагмент содержит замены V26W и E16R.

**[0011]** В одном из вариантов реализации предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий пару Ск/СН1, в которой Ск- и СН1-фрагменты содержат аминокислотные остатки, выбранные из группы, состоящей из: (а)

26W в Ск и 11K и 28N в СН1; (b) 11W и 26G в Ск и 11W в СН1; (c) 26W в Ск и 11W в СН1; (d) 17R в Ск и 9D в СН1; (e) 17K в Ск и 9D в СН1; и их комбинаций.

**[0012]** В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит вторую пару Ск/СН1. Указанная вторая пара Ск/СН1 может быть дикого типа или содержать группу мутаций. Группа мутаций может быть такой же, как в первой паре Ск/СН1, но предпочтительно отличается так, что между парами отсутствует ошибочное спаривание.

**[0013]** В другом варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий Ск-домен, содержащий модификацию аминокислоты в положении V26 и/или F11, и СН1-домен, содержащий модификацию аминокислоты в положении Leu11, при этом указанные модифицированные аминокислоты взаимодействуют друг с другом, когда Ск-домен спаривается с СН1-доменом. В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 8, в котором Ск-домен не взаимодействует с СН1-доменом дикого типа, и СН1-домен не взаимодействует с Ск-доменом дикого типа. В некоторых вариантах реализации модифицированные аминокислоты выбраны из таблицы 1.

**[0014]** В другом варианте реализации предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий Ск-домен, содержащий модификацию аминокислоты в положении Q17, и СН1-домен, содержащий модификацию аминокислоты в положении F9, при этом указанные модифицированные аминокислоты взаимодействуют друг с другом, когда Ск-домен спаривается с СН1-доменом. В некоторых вариантах реализации Ск-домен не взаимодействует с СН1-доменом дикого типа, и СН1-домен не взаимодействует с Ск-доменом дикого типа. В некоторых вариантах реализации модифицированные аминокислоты выбраны из таблицы 2.

**[0015]** В некоторых вариантах реализации также предложено биспецифическое антитело, содержащее первую пару Ск/СН1 и вторую пару Ск/СН1, при этом Ск- и СН1-фрагменты первой пары содержат аминокислотные остатки, выбранные из группы, состоящей из: (a) 26W в Ск и 11K и 28N в СН1; (b) 11W и 26G в Ск и 11W в СН1; (c) 26W в Ск и 11W в СН1; (d) 17R в Ск и 9D в СН1; (e) 17K в Ск и 9D в СН1; и их комбинаций, и Ск- и СН1-фрагменты второй пары относятся к дикому типу или содержат другой набор аминокислотных остатков, выбранных из (a)-(e).

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

**[0016]** На **фиг.1** представлена кристаллическая структура пары Ск- и СН1-доменов (из 1CZ8), демонстрирующая их взаимодействия (остатки, вовлеченные в водородную связь,

окрашены в розовый цвет, солевой мостик в желтый цвет; остатки, обеспечивающие гидрофобные взаимодействия, представляют собой палочки, окрашенные в синий или зеленый цвет).

[0017] На **фиг.2** показаны несколько остатков в Ск- и СН1-домене, которые могут иметь важное значение для поддержания взаимодействия между указанными доменами.

[0018] На **фиг.3** представлено изображение SDS-ПААГ-геля в восстанавливающих условиях для мутаций ala/trp для различных пар аминокислот, обеспечивающих взаимодействие.

[0019] На **фиг.4А-4D** представлены изображения SDS-ПААГ-гелей в восстанавливающих условиях для различных пар мутаций, анализируемых в Примере 3.

[0020] На **фиг.5А-В** представлены изображения SDS-ПААГ-геля в восстанавливающих условиях (5А) и SDS-ПААГ-геля в невосстанавливающих условиях (5В), демонстрирующие связывание между Ск- и СН1-доменами.

[0021] На **фиг.6А-С** представлены изображения гелей, демонстрирующие связывание между тяжелыми и легкими цепями антител, некоторые из которых содержали мутации.

[0022] На **фиг.7А-D** представлены структуры различных биспецифических антител.

[0023] На **фиг.8А-В** представлены данные, демонстрирующие связывание и функциональную активность тестируемых биспецифических антител в отношении их соответствующих мишеней связывания.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

### ***Определения***

[0024] Следует отметить, что термин, называющий объект в единственном числе, относится к одному или более из таких объектов; например, понятно, что термин «антитело» означает одно или более антител. Таким образом, термины в единственном числе, «один или более» и «по меньшей мере один» могут являться взаимозаменяемыми в настоящем описании.

[0025] В настоящем описании термин «полипептид» включает единичный «полипептид», а также множество «полипептидов» и относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно связанных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин «полипептид» относится к любой цепи или цепям из двух или более аминокислот и не относится к конкретной длине продукта. Таким образом, пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, «белок», «цепь аминокислот» или любой другой термин, употребляемый для обозначения цепи или цепей из двух или более аминокислот,

включены в определение «полипептида», и термин «полипептид» может употребляться вместо любого из этих терминов или взаимозаменяемо. Термин «полипептид» также относится к продуктам постэкспрессионных модификаций полипептида, включая, без ограничения, гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию известными защитными/блокирующими группами, протеолитическое расщепление или модификацию не встречающимися в природе аминокислотами. Полипептид может быть получен из природного биологического источника или получен посредством рекомбинантной технологии, но не обязательно транслируется с указанной последовательности нуклеиновой кислоты. Он может быть получен любым способом, в том числе путем химического синтеза.

**[0026]** В настоящем описании термин «выделенный» применительно к клеткам, нуклеиновым кислотам, таким как ДНК или РНК, относится к молекулам, отделенным от других ДНК или РНК соответственно, которые присутствуют в природном источнике указанной макромолекулы. В настоящем описании термин «выделенный» также относится к нуклеиновой кислоте или пептиду, который по существу не содержит клеточного материала, вирусного материала или среды для культивирования в случае получения методами рекомбинантных ДНК, или химических предшественников или других химических веществ в случае получения путем химического синтеза. Более того, термин «выделенная нуклеиновая кислота» включает фрагменты нуклеиновой кислоты, которые не встречаются в природе в виде фрагментов и которые не обнаруживают в естественном состоянии. В настоящем описании термин «выделенный» также относится к клеткам или полипептидам, которые выделены из других клеточных белков и тканей. Термин «выделенные полипептиды» включает как очищенные, так и рекомбинантные полипептиды.

**[0027]** В настоящем описании термин «рекомбинантный» в отношении полипептидов или полинуклеотидов подразумевает форму полипептида или полинуклеотида, которая не существует в природе и которая, в качестве неограничивающего примера, может быть получена путем объединения полинуклеотидов или полипептидов, которые обычно не встречаются вместе.

**[0028]** Термин «гомология» или «идентичность», или «сходство» относится к сходству последовательностей двух пептидов или двух молекул нуклеиновой кислоты. Гомология может быть определена путем сравнения положения в каждой последовательности, которая может быть выровнена для целей сравнения. Когда положение в сравниваемой последовательности занято таким же основанием или аминокислотой, тогда молекулы являются гомологичными в этом положении. Степень гомологии между

последовательностями зависит от количества совпадающих или гомологичных положений, общих для указанных последовательностей. «Неродственная» или «негомологичная» последовательность менее чем на 40% идентична, даже предпочтительно менее чем на 25% идентична одной из последовательностей согласно настоящему изобретению.

**[0029]** Выражение что полинуклеотид или область полинуклеотида (или полипептид или область полипептида) обладает определенным процентом (например, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) «идентичности последовательности» другой последовательности означает, что при выравнивании этот процент оснований (или аминокислот) одинаков при сравнении двух последовательностей. Это выравнивание и процент гомологии или идентичности последовательностей могут быть определены с применением программного обеспечения, известного в этой области техники, например, описанного в Ausubel *et al.* eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*. Предпочтительно, для выравнивания используют параметры по умолчанию. Одна из программ выравнивания представляет собой BLAST, в которой используют параметры по умолчанию. В частности, программы представляют собой BLASTN и BLASTP, в которых используют следующие параметры по умолчанию: генетический код = стандартный; фильтр = нет; цепь = обе; отсекание = 60; ожидаемое = 10; матрица = BLOSUM62; описания = 50 последовательностей; сортировка по = наибольшее количество баллов; базы данных = избыточные, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + SwissProtein + SPupdate + PIR. Биологически эквивалентными полинуклеотидами являются те, которые демонстрируют вышеуказанный процент гомологии и кодируют полипептид, обладающий такой же или схожей биологической активностью.

**[0030]** Термин «эквивалентная нуклеиновая кислота или полинуклеотид» относится к нуклеиновой кислоте, содержащей нуклеотидную последовательность, демонстрирующую определенную степень гомологии или идентичности последовательности по отношению к нуклеотидной последовательности нуклеиновой кислоты или ее комплементарной последовательности. Гомолог двухцепочечной нуклеиновой кислоты включает нуклеиновые кислоты, содержащие нуклеотидную последовательность, которая демонстрирует определенную степень гомологии с или с ее комплементарной последовательностью. В соответствии с одним из аспектов гомологи нуклеиновых кислот способны гибридизоваться с нуклеиновой кислотой или ее комплементарной последовательностью. Аналогичным образом термин «эквивалентный полипептид» относится к полипептиду, демонстрирующему определенную степень гомологии или идентичности последовательности по отношению к аминокислотной последовательности эталонного полипептида. В соответствии с некоторыми аспектами идентичность

последовательности составляет по меньшей мере примерно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%. В соответствии с некоторыми аспектами эквивалентный полипептид или полинуклеотид содержит одно, два, три, четыре или пять присоединений, делеций, замен и их комбинаций по сравнению с эталонным полипептидом или полинуклеотидом. В соответствии с некоторыми аспектами эквивалентная последовательность сохраняет активность (например, связывания эпитопа) или структуру (например, солевой мостик) эталонной последовательности.

**[0031]** Реакции гибридизации могут быть проведены в условиях различной «жесткости». Как правило, реакцию гибридизации в условиях пониженной жесткости проводят при примерно 40°C в примерно 10 × SSC или растворе с эквивалентной ионной силой/температурой. Гибридизацию в условиях умеренной жесткости, как правило, проводят при примерно 50°C в примерно 6 × SSC, и реакцию гибридизации в условиях повышенной жесткости обычно проводят при примерно 60°C в примерно 1 × SSC. Реакции гибридизации можно также проводить в «физиологических условиях», которые хорошо известны специалисту в этой области техники. Неограничивающим примером физиологических условий является температура, ионная сила, pH и концентрация Mg<sup>2+</sup>, обычно обнаруживаемая в клетке.

**[0032]** Полинуклеотид состоит из конкретной последовательности четырех нуклеотидных оснований: аденина (A); цитозина (C); гуанина (G); тимина (T); и урацила (U) вместо тимина, когда полинуклеотид представляет собой РНК. Таким образом, термин «последовательность полинуклеотида» представляют собой буквенное представление молекулы полинуклеотида. Такое буквенное представление можно вводить в базы данных в компьютере, имеющем центральный процессор, и использовать в биоинформатике, например, в функциональной геномике и поиске гомологии. Термин «полиморфизм» относится к сосуществованию более одной формы гена или его части. Часть гена, у которой существуют по меньшей мере две различные формы, т.е. две различные нуклеотидные последовательности, называют «полиморфной областью гена». Полиморфная область может представлять собой один нуклеотид, идентичность которого отличается в различных аллелях.

**[0033]** Термины «полинуклеотид» и «олигонуклеотид» являются взаимозаменяемыми и относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, либо дезоксирибонуклеотидов, либо рибонуклеотидов, либо их аналогов. Полинуклеотиды могут иметь любую трехмерную структуру и могут выполнять любую функцию, известную или неизвестную. Неограничивающие примеры полинуклеотидов являются следующими: ген или фрагмент гена (например, зонд, праймер, EST- или SAGE-метка), экзоны, интроны,



матричная РНК (мРНК), транспортная РНК, рибосомальная РНК, рибозимы, кДНК, двухцепочечная РНК (дцРНК), малая интерферирующая РНК (миРНК), микроРНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенная ДНК с любой последовательностью, выделенная РНК с любой последовательностью, зонды на основе нуклеиновых кислот и праймеры. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов. При наличии, модификации структуры нуклеотида можно осуществлять до или после сборки полинуклеотида. Последовательность нуклеотидов может быть прервана ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид можно дополнительно модифицировать после полимеризации, например, путем конъюгации с компонентом-меткой. Указанный термин также относится как к двух-, так и одноцепочечным молекулам. Если не указано иное или иное не предусмотрено требованиями, любой вариант реализации настоящего изобретения, который представляет собой полинуклеотид, включает как двухцепочечную форму, так и каждую из двух комплементарных одноцепочечных форм, которые, как известно или прогнозируют, составляют двухцепочечную форму.

**[0034]** Термин «кодировать» применительно к полинуклеотидам относится к полинуклеотиду, который, как говорят, «кодирует» полипептид, если в нативном состоянии или после манипуляций способами, хорошо известными специалисту в этой области техники, он может транскрибироваться и/или транслироваться с получением мРНК для указанного полипептида и/или его фрагмента. Антисмысловая цепь комплементарна такой нуклеиновой кислоте и из нее может быть выведена кодирующая последовательность.

**[0035]** В настоящем описании термин «антитело» или «антигенсвязывающий полипептид» относится к полипептиду или полипептидному комплексу, который специфично распознает антиген и связывается с ним. Антитело может представлять собой целое антитело и его любой антигенсвязывающий фрагмент или одну цепь. Таким образом, термин «антитело» включает любую молекулу, содержащую белок или пептид, которая содержит по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, обладающую биологической активностью связывания с антигеном. Примеры включают, но не ограничиваются указанными, определяющую комплементарность область (CDR) тяжелой или легкой цепи, или ее лигандсвязывающую часть, переменную область тяжелой цепи или легкой цепи, константную область тяжелой цепи или легкой цепи, каркасную (FR) область или любую их часть, или по меньшей мере одну часть связывающего белка.

**[0036]** В настоящем описании термин «фрагмент антитела» или «антигенсвязывающий фрагмент» представляет собой часть антитела, такую как F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab, Fv, scFv

и т.п. Независимо от структуры фрагмент антитела связывается с тем же антигеном, который распознает интактное антитело. Термин «фрагмент антитела» включает аптамеры, шпигельмеры (spiegelmer) и диатела. Термин «фрагмент антитела» также включает любой полученный путем синтеза или генетически сконструированный белок, который действует как антитело путем связывания с конкретным антигеном с образованием комплекса.

**[0037]** Термин «одноцепочечный переменный фрагмент» или «scFv» относится к белку слияния переменных областей тяжелых ( $V_H$ ) и легких цепей ( $V_L$ ) иммуноглобулинов. В соответствии с некоторыми аспектами указанные области соединены коротким линкерным пептидом, состоящим из: от десяти до примерно 25 аминокислот. Линкер может содержать большое количество глицина для гибкости, а также серина или треонина для растворимости, и может либо соединять N-конец  $V_H$  с C-концом  $V_L$ , либо наоборот. Этот белок сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина несмотря на удаление константных областей и введение линкера. Молекулы ScFv известны в этой области техники и описаны, например, в патенте США 5892019.

**[0038]** Термин «антитело» включает различные широкие классы полипептидов, которые можно различать биохимически. Для специалиста в этой области техники очевидно, что тяжелые цепи классифицируют как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) с некоторыми подклассами среди них (например,  $\gamma 1$ - $\gamma 4$ ). Именно природа этой цепи определяет «класс» антитела как IgG, IgM, IgA, IgG или IgE соответственно. Подклассы (изотипы) иммуноглобулинов, например, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgG<sub>5</sub> и т.д. хорошо описаны и, как известно, обеспечивают функциональную специализацию. Модифицированные варианты каждого из этих классов и изотипов легко определимы для специалиста в свете настоящего описания и, соответственно, включены в объем настоящего изобретения. Все классы иммуноглобулинов явным образом включены в объем настоящего изобретения; следующее описание в целом направлено на класс IgG молекул иммуноглобулина. Применительно к IgG стандартная молекула иммуноглобулина содержит два идентичных полипептида легкой цепи с молекулярной массой приблизительно 23000 Дальтон и два идентичных полипептида тяжелой цепи с молекулярной массой 53000-70000. Указанные четыре цепи, как правило, соединены дисульфидными связями в «Y»-конфигурации, в которой легкие цепи окружают тяжелые цепи, начиная от «входа» «Y» и продолжая через переменную область.

**[0039]** Антитела, антигенсвязывающие полипептиды, их варианты или производные согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются указанными, поликлональные, моноклональные, полиспецифические антитела, антитела человека, гуманизированные, приматизированные или химерные антитела, одноцепочечные

антитела, эпитопсвязывающие фрагменты, например, Fab, Fab' и F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fvs, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, дисульфид-связанные Fv (sdFv), фрагменты, содержащие либо VK-, либо VH-домен, фрагменты, полученные посредством библиотеки экспрессии Fab, и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-Id антитела к антителам LIGHT, описанным в настоящем документе). Молекулы иммуноглобулина или антитела согласно настоящему изобретению могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекулы иммуноглобулина.

**[0040]** Легкие цепи классифицируют либо как каппа, либо как лямбда (K, λ). Тяжелая цепь каждого класса может быть связана либо с каппа-, либо с лямбда-легкой цепью. В целом, легкие и тяжелые цепи ковалентно связаны друг с другом и «хвостовые» части двух тяжелых цепей связаны друг с другом ковалентными дисульфидными связями или нековалентными связями, когда иммуноглобулины получают либо посредством гибридом, В-клеток, либо генетически сконструированных клеток-хозяев. В тяжелой цепи аминокислотные последовательности направлены от N-конца в раздвоенных концах Y-конфигурации к C-концу в нижней части каждой цепи.

**[0041]** Как легкие, так и тяжелые цепи делятся на области структурной и функциональной гомологии. Термины «константный» и «вариабельный» употребляются с точки зрения функций. В связи с этим понятно, что вариабельные домены частей как легкой (VL), так и тяжелой (VH) цепи определяют распознавание антигена и специфичность к антигену. Константные домены легкой цепи (СК) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3), напротив, придают важные биологические свойства, такие как секреция, трансплацентарная подвижность, связывание Fc-рецептора, связывание комплемента и т.п. Согласно правилу нумерация доменов константной области возрастает по мере их удаления от антигенсвязывающего центра или аминоконца антитела. N-концевая часть представляет собой вариабельную область, а в C-концевой части расположена константная область; CH3- и СК-домены в действительности содержат карбоксиконец тяжелой и легкой цепи соответственно.

**[0042]** Как указано выше, вариабельная область позволяет антителу селективно распознавать и специфично связывать эпитопы на антигенах. То есть VK-домен и VH-домен или подгруппа определяющих комплементарность областей (CDR) антитела объединяются с образованием вариабельной области, которая определяет трехмерный антигенсвязывающий центр. Эта четвертичная структура антитела образует антигенсвязывающий центр, присутствующий на конце каждого «плеча» Y. В частности, антигенсвязывающий центр определен тремя CDR на каждой из VH- и VK-цепей (т.е. CDR-

H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3). В некоторых случаях, например, в случае некоторых молекул иммуноглобулина, полученных от верблюдовых или сконструированных на основе иммуноглобулинов верблюдовых, целая молекула иммуноглобулина может состоять только из тяжелых цепей с отсутствием легких цепей. См., например, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993).

**[0043]** Во встречающихся в природе антителах шесть «определяющих комплементарность областей» или «CDR», которые присутствуют в каждом антигенсвязывающем домене, представляют собой короткие несмежные последовательности аминокислот, которые расположены особым образом с образованием антигенсвязывающего домена, когда антитело принимает трехмерную конфигурацию в водной среде. Остальные аминокислоты в антигенсвязывающих доменах, называемые «каркасными» областями, демонстрируют меньшую межмолекулярную вариабельность. Каркасные области принимают главным образом конформацию  $\beta$ -складчатого слоя, и CDR образуют петли, которые соединяют и в некоторых случаях образуют часть  $\beta$ -складчатой структуры. Таким образом, каркасные области образуют остов, который обеспечивает расположение CDR в правильной ориентации за счет межцепочечных нековалентных взаимодействий. Антигенсвязывающий домен, образованный указанными расположенными CDR, определяет поверхность, комплементарную эпитопу на иммунореактивном антигене. Эта комплементарная поверхность способствует нековалентному связыванию антитела с распознанным эпитопом. Специалист в этой области техники может легко идентифицировать аминокислоты, составляющие CDR-области и каркасные области соответственно, для любой конкретной вариабельной области тяжелой или легкой цепи, поскольку они точно определены (см. “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” Kabat, E., *et al.*, U.S. Department of Health and Human Services, (1983); и Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)).

**[0044]** В случае, когда существуют два или более определений термина, употребляемого и/или общепринятого в этой области техники, определение указанного термина в настоящем описании включает все такие значения, если явным образом не указано противоположное. Конкретным примером является использование термина «определяющая комплементарность область» («CDR») для описания несмежных антигенсвязывающих центров, обнаруживаемых в вариабельной области полипептидов как тяжелой, так и легкой цепи. Эта конкретная область описана Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of Proteins of Immunological Interest” (1983) и Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), полное содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки. Определения CDR согласно Кабату и Чотиа включают

перекрывание подгрупп аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Однако использование любого определения, относящегося к CDR антитела или его вариантов, включено в объем указанного термина, определенного и употребляемого в настоящем описании. Соответствующие аминокислотные остатки, которые охватывают CDR, определенные каждым из вышеуказанных источников, представлены в таблице ниже для сравнения. Точные номера остатков, которые охватывают конкретную CDR, будут варьироваться в зависимости от последовательности и размера указанной CDR. Специалист в этой области техники может рутинно определить, какие остатки составляют конкретную CDR, с учетом аминокислотной последовательности варибельной области антитела.

	<b>Кабат</b>	<b>Чотиа</b>
CDR-H1	31-35	26-32
CDR-H2	50-65	52-58
CDR-H3	95-102	95-102
CDR-L1	24-34	26-32
CDR-L2	50-56	50-52
CDR-L3	89-97	91-96

**[0045]** Кабат и др. также определили систему нумерации для последовательностей варибельных доменов, которая применима к любому антителу. Специалист в этой области техники может однозначно соотнести эту систему «нумерации согласно Кабату» с любой последовательностью варибельного домена без опоры на какие-либо экспериментальные данные помимо самой последовательности. В настоящем описании термин «нумерация согласно Кабату» относится к системе нумерации, изложенной в Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequence of Proteins of Immunological Interest” (1983).

**[0046]** В дополнение к таблице выше система нумерации согласно Кабату описывает CDR-области следующим образом: CDR-H1 начинается приблизительно на аминокислоте 31 (т.е. приблизительно через 9 остатков после первого остатка цистеина), содержит приблизительно 5-7 аминокислот и заканчивается на следующем остатке триптофана. CDR-H2 начинается на пятнадцатом остатке после окончания CDR-H1, содержит приблизительно 16-19 аминокислот и заканчивается на следующем остатке аргинина или лизина. CDR-H3 начинается приблизительно на тридцать третьем аминокислотном остатке после окончания CDR-H2; содержит 3-25 аминокислот; и заканчивается на последовательности W-G-X-G, где X представляет собой любую аминокислоту. CDR-L1 начинается приблизительно на остатке 24 (т.е. после остатка цистеина); содержит приблизительно 10-17 остатков; и заканчивается на следующем остатке триптофана. CDR-L2 начинается приблизительно на шестнадцатом остатке после окончания CDR-L1 и содержит приблизительно 7 остатков. CDR-L3 начинается приблизительно на тридцать

третьем остатке после окончания CDR-L2 (т.е. после остатка цистеина); содержит приблизительно 7-11 остатков и заканчивается на последовательности F или W-G-X-G, где X представляет собой любую аминокислоту.

**[0047]** Некоторые другие системы нумерации включают «нумерацию IMGT» и «нумерацию экзонов IMGT». Например, в следующей таблице показана корреляция между системой нумерации экзонов IMGT и системой нумерации согласно Кабату для константных доменов CH1 и Ск.

## Нумерация экзонов IMGT и нумерация согласно Кабату для CN1

Нумерация экзонов IMGT	Нумерация согласно Кабату	Нумерация экзонов IMGT	Нумерация согласно Кабату	Нумерация экзонов IMGT	Нумерация согласно Кабату
1	114	41	157	81	206
2	115	42	162	82	207
3	116	43	163	83	208
4	117	44	164	84	209
5	118	45	165	85	210
6	119	46	166	86	211
7	120	47	167	87	212
8	121	48	168	88	213
9	122	49	169	89	214
10	123	50	171	90	215
11	124	51	172	91	216
12	125	52	173	92	217
13	126	53	174	93	218
14	127	54	175	94	219
15	128	55	176	95	220
16	129	56	177	96	221
17	130	57	178	97	222
18	133	58	179	98	223
19	134	59	180		
20	135	60	182		
21	136	61	183		
22	137	62	184		
23	138	63	185		
24	139	64	186		
25	140	65	187		
26	141	66	188		
27	142	67	189		
28	143	68	190		
29	144	69	191		
30	145	70	192		
31	146	71	193		
32	147	72	194		
33	148	73	195		
34	149	74	196		
35	150	75	197		
36	151	76	198		
37	152	77	199		
38	153	78	200		
39	154	79	203		
40	156	80	205		

## Нумерация экзонов IMGT и нумерация согласно Кабату для Ск

Нумерация экзонов IMGT	Нумерация согласно Кабату	Нумерация экзонов IMGT	Нумерация согласно Кабату	Нумерация экзонов IMGT	Нумерация согласно Кабату
1	108	41	148	81	188
2	109	42	149	82	189
3	110	43	150	83	190
4	111	44	151	84	191
5	112	45	152	85	192
6	113	46	153	86	193
7	114	47	154	87	194
8	115	48	155	88	195
9	116	49	156	89	196
10	117	50	157	90	197
11	118	51	158	91	198
12	119	52	159	92	199
13	120	53	160	93	200
14	121	54	161	94	201
15	122	55	162	95	202
16	123	56	163	96	203
17	124	57	164	97	204
18	125	58	165	98	205
19	126	59	166	99	206
20	127	60	167	100	207
21	128	61	168	101	208
22	129	62	169	102	209
23	130	63	170	103	210
24	131	64	171	104	211
25	132	65	172	105	212
26	133	66	173	106	213
27	134	67	174	107	214
28	135	68	175		
29	136	69	176		
30	137	70	177		
31	138	71	178		
32	139	72	179		
33	140	73	180		
34	141	74	181		
35	142	75	182		
36	143	76	183		
37	144	77	184		
38	145	78	185		
39	146	79	186		
40	147	80	187		

**[0048]** Антитела, описанные в настоящем документе, могут происходить от любого животного, включая птиц и млекопитающих. Предпочтительно, антитела представляют собой антитела человека, мыши, осла, кролика, козы, морской свинки, верблюда, ламы, лошади или цыпленка. В другом варианте реализации переменная область может происходить от хрящевых рыб (например, от акул).

**[0049]** В настоящем описании термин «константная область тяжелой цепи» включает аминокислотные последовательности, полученные из тяжелой цепи иммуноглобулина.



Полипептид, содержащий константную область тяжелой цепи, содержит по меньшей мере один из: СН1-домена, шарнирного (например, верхняя, средняя и/или нижняя шарнирная область) домена, СН2-домена, СН3-домена или их варианта, или фрагмента. Например, антигенсвязывающий полипептид для применения согласно настоящему изобретению может содержать полипептидную цепь, содержащую СН1-домен; полипептидную цепь, содержащую СН1-домен, по меньшей мере часть шарнирного домена и СН2-домен; полипептидную цепь, содержащую СН1-домен и СН3-домен; полипептидную цепь, содержащую СН1-домен, по меньшей мере часть шарнирного домена и СН3-домен, или полипептидную цепь, содержащую СН1-домен, по меньшей мере часть шарнирного домена, СН2-домен и СН3-домен. В другом варианте реализации полипептид согласно настоящему изобретению содержит полипептидную цепь, содержащую СН3-домен. Более того, антитело для применения согласно настоящему изобретению может не содержать по меньшей мере части СН2-домена (например, целого СН2-домена или его части). Как указано выше, для специалиста в этой области техники очевидно, что константная область тяжелой цепи может быть модифицирована так, что ее аминокислотная последовательность отличается от встречающейся в природе молекулы иммуноглобулина.

**[0050]** Константная область тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем документе, может быть получена из различных молекул иммуноглобулинов. Например, константная область тяжелой цепи полипептида может содержать СН1-домен, полученный из молекулы IgG<sub>1</sub>, и шарнирную область, полученную из молекулы IgG<sub>3</sub>. В другом примере константная область тяжелой цепи может содержать шарнирную область, полученную частично из молекулы IgG<sub>1</sub> и частично из молекулы IgG<sub>3</sub>. В другом примере часть тяжелой цепи может содержать химерную шарнирную область, полученную частично из молекулы IgG<sub>1</sub> и частично из молекулы IgG<sub>4</sub>.

**[0051]** В настоящем описании термин «константная область легкой цепи» включает аминокислотные последовательности, полученные из легкой цепи антитела. Предпочтительно, константная область легкой цепи содержит по меньшей мере один из: константного каппа-домена или константного лямбда-домена.

**[0052]** Термин «пара легкая цепь-тяжелая цепь» относится к набору легкой цепи и тяжелой цепи, который может образовывать димер через дисульфидную связь между СL-доменом легкой цепи и СН1-доменом тяжелой цепи.

**[0053]** Как указано выше, структуры субъединиц и трехмерная конфигурация константных областей различных классов иммуноглобулинов хорошо известны. В настоящем описании термин «VH-домен» включает аминоконцевой вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, и термин «СН1-домен» включает первый (самый близкий

к аминоконцу) домен константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. CH1-домен примыкает к VH-домену и является аминоконцевым для шарнирной области молекулы тяжелой цепи иммуноглобулина.

**[0054]** В настоящем описании термин «CH2-домен» включает часть молекулы тяжелой цепи, которая простирается, например, от примерно остатка 244 до остатка 360 антитела при использовании традиционных схем нумерации (остатки с 244 по 360, система нумерации согласно Кабату; и остатки 231-340, система нумерации EU; см. Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of Proteins of Immunological Interest” (1983)). CH2-домен уникален тем, что он не спарен тесно с другим доменом. Скорее две N-связанные разветвленные углеводные цепи расположены между двумя CH2-доменами интактной нативной молекулы IgG. Также документально подтверждено, что CH3-домен простирается от CH2-домена до C-конца молекулы IgG и содержит приблизительно 108 остатков.

**[0055]** В настоящем описании термин «шарнирная область» включает часть молекулы тяжелой цепи, которая соединяет CH1-домен с CH2-доменом. Эта шарнирная область содержит приблизительно 25 остатков и является гибкой, что таким образом позволяет двум N-концевым антигенсвязывающим областям независимо двигаться. Шарнирные области могут быть подразделены на три отдельных домена: верхний, средний и нижний шарнирные домены (Roux *et al.*, *J. Immunol* 161:4083 (1998)).

**[0056]** В настоящем описании термин «дисульфидная связь» включает ковалентную связь, образованную между двумя атомами серы. Аминокислота цистеин содержит тиольную группу, которая может образовывать дисульфидную связь или мостик со второй тиольной группой. В большинстве встречающихся в природе молекул IgG CH1- и СК-области связаны дисульфидной связью и две тяжелые цепи связаны двумя дисульфидными связями в положениях, соответствующих 239 и 242 при использовании системы нумерации согласно Кабату (положение 226 или 229, система нумерации EU).

**[0057]** В настоящем описании термин «химерное антитело» означает любое антитело, в котором иммунореактивная область или участок получен или происходит от первого вида, а константная область (которая может быть интактной, частичной или модифицированной в соответствии с настоящим изобретением) получена от второго вида. В некоторых вариантах реализации целевая связывающая область или участок получен из источника, не относящегося к человеку (например, мыши или примата), а константная область представляет собой константную область человека.

**[0058]** В настоящем описании «процент гуманизации» рассчитывают путем определения количества отличий аминокислот каркасной области (т.е. отличий не CDR)

между гуманизированным доменом и доменом зародышевой линии, вычитания этого количества из общего количества аминокислот, а затем деления результата на общее количество аминокислот и умножения на 100.

**[0059]** Термин «специфично связывает» или «обладает специфичностью в отношении» в целом означает, что антитело связывается с эпитопом через антигенсвязывающий домен, и что указанное связывание предполагает некоторую комплементарность между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. В соответствии с этим определением говорят, что антитело «специфично связывается» с эпитопом, когда оно связывается с этим эпитопом через антигенсвязывающий домен легче, чем оно бы связывалось со случайным неродственным эпитопом. В настоящем описании термин «специфичность» употребляется для определения относительной аффинности, с которой определенное антитело связывается с определенным эпитопом. Например, можно считать, что антитело «А» обладает большей специфичностью в отношении конкретного эпитопа, чем антитело «В», или можно сказать, что антитело «А» связывается с эпитопом «С» с большей специфичностью, чем с родственным эпитопом «D».

#### ***Модифицированные С<sub>к</sub>- и С<sub>Н1</sub>-домены***

**[0060]** Биспецифические антитела (BsAb), которые направленно воздействуют на два антигена или эпитопа, объединяют в одной молекуле специфичность и свойства двух различных моноклональных антител (mAb). Когда присутствуют два набора парных фрагментов VH-Ch1:VL-CL, может происходить ошибочное спаривание. Для того чтобы избежать ошибочного спаривания фрагментов VH-CH1:VL-CL, полученных из двух различных антител, применяли множество способов, таких как Cross-Mab, общая легкая цепь и FITIg.

**[0061]** Задача приведенных в качестве примера экспериментов состояла в введении мутаций в С<sub>к</sub>- и/или С<sub>Н1</sub>-домен, в частности, в домены человека, для уменьшения ошибочного спаривания. Предпочтительно, мутантный С<sub>к</sub> может демонстрировать хорошее связывание с мутантным С<sub>Н1</sub>, но мутантный С<sub>к</sub> не связывается или слабо связывается с немутированным С<sub>Н1</sub>-доменом, а мутантный С<sub>Н1</sub> демонстрирует слабое связывание или отсутствие связывания с немутированным С<sub>к</sub>.

**[0062]** Сначала анализировали остатки на интерфейсе С<sub>к</sub> и С<sub>Н1</sub> человека, имеющие важное значение, и обнаружили пять «горячих точек». Для подтверждения важного значения этих остатков осуществляли мутации каждого остатка на аланин или триптофан. Мутации в Gln17 в С<sub>к</sub> (С<sub>к</sub>\_Q17) или Phe9 в С<sub>Н1</sub> (С<sub>Н1</sub>\_F9) и мутации в Val26 или Phe11 в С<sub>к</sub>(С<sub>к</sub>\_V26\_F11) или Leu11 в С<sub>Н1</sub> (С<sub>Н1</sub>\_L11) приводили к гораздо меньшему спариванию легких и тяжелых цепей. Эти результаты подтвердили, что группы: С<sub>к</sub>\_Q17/С<sub>Н1</sub>\_F9

(обозначаемая как пара 1 в примерах) и Ск\_V26\_F11/СН1\_L11 (обозначаемая как пара 2 в примерах) имеют важное значение для взаимодействия Ск и СН1. Затем экспрессировали и анализировали мутации, которые могут потенциально восстанавливать спаривание. Такие модификации могут особенно подходить для получения биспецифических антител, содержащих две различные пары Ск- и СН1-доменов.

**[0063]** Для остатков Ск\_V26\_F11/СН1\_L11 (и возможно L28) на интерфейсе показано или предполагают, что следующие мутации способны восстанавливать спаривание Ск- и СН1-доменов:

**Таблица 1. Группы мутаций для Ск в 26 и возможно в 11, и для СН1 в 11 и возможно в 28**

№	Ск (в 26 и/или 11)	СН1 (в 11 и/или 28)
1	26W	11W
2	26W	11K и 28N
3	11W и 26G	11W
4	11W и 26G	11K и 28N
5	26F	11F
6	26W	11F
7	26F	11W
8	26L	11W
9	26M	11W
10	26E	11W
11	26W	11W и 28R
12	11A и 26W	11W

**[0064]** Подобным образом для остатков Ск\_Q17/СН1\_F9 на интерфейсе показано или предполагают, что следующие мутации способны восстанавливать спаривание Ск- и СН1-доменов:

**Таблица 2. Группы мутаций в 17 Ск/9 СН1**

№	Ск (в 17)	СН1 (в 9)
1	17R	9D
2	17K	9D
3	17R	9E
4	17K	9E
5	17D	9R
6	17D	9K
7	17H	9I
8	17R	9H
9	17H	9H
10	17R	9P
11	17D	9H
12	17I	9H
13	17H	9M
14	17R	9Q
15	17H	9Q

**[0065]** Как показано в Примере 7, дополнительные замены аминокислот, которые разрушают один или более существующих солевых мостиков в Ск- и СН1-доменах дикого типа и вновь «устанавливают» новые, могут дополнительно повышать желаемую специфичность спаривания. Пары Ск/СН1 дикого типа содержат солевые мостики между СН1\_K96 и Ск\_E16, между СН1\_K101 и Ск\_D15, и между СН1\_H51 и Ск\_D60. Каждый из этих солевых мостиков может являться подходящим участком для замен.

**[0066]** Например, в каждом из солевых мостиков положительно заряженная аминокислота (например, К, R или H) может быть заменена отрицательно заряженной аминокислотой (например, E или D), и отрицательно заряженная аминокислота (например, E или D) может быть заменена положительно заряженной аминокислотой (например, К, R или H). Одним из таких примеров является СН1\_K101E/Ск\_D15K или Ск\_D15H; другим примером является СН1\_K96D/Ск\_E16R; другим примером является СН1\_96E/Ск\_E16K; и другим примером является СН1\_H51D/Ск\_D60K. Эти и другие примеры проиллюстрированы в **таблице 3**. Каждый из таких солевых мостиков с заменами можно независимо использовать для нового спаривания СН1/Ск или в дополнение к любой из других замен, описанных в настоящем документе.

**Таблица 3. Разрушенные и вновь установленные солевые мостики**

№	СН1	Ск
1	K101E	D15H
2	K101E	D15K
3	K101E	D15R
4	K101D	D15H
5	K101D	D15K
6	K101D	D15R
7	K96D	E16R
8	K96E	E16K
9	K96D	E16K
10	K96E	E16R
11	K96D	E16H
12	K96E	E16H
13	H51D	D60K
14	H51D	D60R
15	H51D	D60H
16	H51E	D60K
17	H51E	D60R
16	H51E	D60H

**[0067]** В одном из вариантов реализации описанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит СН1-фрагмент, содержащий замены L11W и K101E, и Ск-фрагмент, содержащий замены V26W и D15K/H. В одном из вариантов реализации описанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит СН1-фрагмент, содержащий замены L11W и K96D, и Ск-фрагмент, содержащий замены V26W

и E16R. В одном из вариантов реализации описанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит СН1-фрагмент, содержащий замены L11W и K96E, и Ск-фрагмент, содержащий замены V26W и E16K.

**[0068]** Эти группы мутаций могут подходить для получения мутированных Ск- и СН1-доменов, способных связывать друг друга, которые не могут связываться или демонстрируют уменьшение связывания со своими СН1- или Ск-доменами-партнерами дикого типа. Такие Ск- и СН1-домены могут быть включены в антитела или антигенсвязывающие фрагменты, в частности, биспецифические.

**[0069]** В одном из сценариев биспецифическое антитело имеет обычную структуру IgG, которая содержит две пары легкая цепь-тяжелая цепь. Каждая тяжелая цепь содержит VH-, СН1-, СН2- и СН3-домены, и каждая легкая цепь содержит VL- и CL-домен (например, Ск). В соответствии с одним из вариантов реализации настоящего изобретения одна из пар Ск/СН1 содержит группу мутаций согласно настоящему изобретению, а другая пара не содержит. В другом варианте реализации настоящего изобретения одна из пар Ск/СН1 содержит группу мутаций согласно настоящему изобретению, а другая пара содержит другую группу мутаций. В некоторых вариантах реализации любая из пар или обе пары содержат две или более групп мутаций (например, одну группу из таблицы 1, а другую группу из таблицы 2).

**[0070]** В другом сценарии биспецифическое антитело имеет обычную структуру IgG, которая дополнительно слита на С-конце Fc-фрагмента с N-концами VH второго Fab-фрагмента. Такое антитело показано на **фиг.7А**. В соответствии с одним из вариантов реализации настоящего изобретения любая из пар Ск/СН1 в N-концевой части Fc-фрагмента или пар Ск/СН1 в С-концевой части Fc-фрагмента содержит группу мутаций согласно настоящему изобретению, а другие пары не содержат. Более того, группа мутаций может быть включена в обе пары Ск/СН1 в N- или С-концевой части Fc-фрагмента.

**[0071]** В другом варианте реализации биспецифическое антитело имеет структуру, представленную на **фиг.7В**. В этой структуре каждая тяжелая цепь и легкая цепь содержит два набора соединенных пар Ск/СН1. Группы мутаций могут быть расположены в любом месте этого антитела, если они способствуют желаемому спариванию. Другое биспецифическое антитело с известным выступом-во-впадину в СН3-доменах представлено на **фиг.7С**. В этом случае группы мутаций согласно настоящему изобретению могут быть встроены в любую из или обе Ск/СН1-пары А и В. Другие примеры, которые не содержат СН2- или СН3-доменов, представлены на **фиг.7D**.

**[0072]** В одном из вариантов реализации настоящего изобретения предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий пару Ск/СН1 человека, в которой

аминокислотный остаток 26 в С<sub>к</sub>-домене представляет собой Trp, и аминокислотный остаток 11 в С<sub>Н1</sub>-домене представляет собой Trp. В соответствии с некоторыми аспектами антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит вторую пару С<sub>к</sub>/С<sub>Н1</sub> человека, в которой аминокислотный остаток 26 во втором С<sub>к</sub>-домене не представляет собой Trp, и аминокислотный остаток 11 во втором С<sub>Н1</sub>-домене не представляет собой Trp. В соответствии с некоторыми аспектами антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит переменную область тяжелой цепи, переменную область легкой цепи, Fc-область или их комбинацию.

**[0073]** В другом варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий С<sub>к</sub>-домен человека, содержащий модификацию аминокислоты в положении Val26 и/или Phe11, и С<sub>Н1</sub>-домен человека, содержащий модификацию аминокислоты в положении Leu11, при этом указанные модифицированные аминокислоты взаимодействуют друг с другом, когда С<sub>к</sub>-домен спаривается с С<sub>Н1</sub>-доменом. В некоторых вариантах реализации модификация аминокислоты представлена в сравнении с С<sub>к</sub>- и С<sub>Н1</sub>-доменами IgG человека. В некоторых вариантах реализации модифицированные аминокислоты выбраны из **таблицы 1**.

**[0074]** В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит вторую пару С<sub>к</sub>/С<sub>Н1</sub>, в которой аминокислотный остаток 26 во втором С<sub>к</sub>-домене представляет собой Val, и аминокислотный остаток 11 во втором С<sub>Н1</sub>-домене представляет собой Leu. В соответствии с некоторыми аспектами аминокислотный остаток 11 во втором С<sub>к</sub>-домене представляет собой Phe.

**[0075]** В другом варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий С<sub>к</sub>-домен, содержащий модификацию аминокислоты в положении Gln17, и С<sub>Н1</sub>-домен, содержащий модификацию аминокислоты в положении Phe9, при этом указанные модифицированные аминокислоты взаимодействуют друг с другом, когда С<sub>к</sub>-домен спаривается с С<sub>Н1</sub>-доменом. В некоторых вариантах реализации модификация аминокислоты представлена в сравнении с С<sub>к</sub>- и С<sub>Н1</sub>-доменами IgG человека. В некоторых вариантах реализации модифицированные аминокислоты выбраны из **таблицы 2**.

**[0076]** В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит вторую пару С<sub>к</sub>/С<sub>Н1</sub>, в которой аминокислотный остаток 17 во втором С<sub>к</sub>-домене представляет собой Gln, и аминокислотный остаток 9 во втором С<sub>Н1</sub>-домене представляет собой Phe.

[0077] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий группу мутаций из **таблицы 1** или группу мутаций из **таблицы 2**. В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит группу мутаций из **таблицы 1** и группу мутаций из **таблицы 2**. В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит группу мутаций из **таблицы 3**.

[0078] Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может относиться к любому известному классу антител, но предпочтительно относится к классу IgG, включая изоформы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Антитело или его фрагмент может представлять собой химерное антитело, гуманизованное антитело или антитело полностью человеческого происхождения.

#### ***Биспецифические/бифункциональные молекулы***

[0079] В некоторых вариантах реализации предложены биспецифические антитела. В некоторых вариантах реализации биспецифическое антитело обладает первой специфичностью к опухолевому антигену или микроорганизму. В некоторых вариантах реализации биспецифическое антитело обладает второй специфичностью к иммунной клетке.

[0080] В некоторых вариантах реализации указанная иммунная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, В-клетки, моноцита, макрофага, нейтрофила, дендритной клетки, фагоцита, естественной клетки-киллера, эозинофила, базофила и тучной клетки. Молекулы на иммунной клетке, на которые можно направленно воздействовать, включают, например, CD3, CD16, CD19, CD28 и CD64. Другие примеры включают PD-1, CTLA-4, LAG-3 (также известный как CD223), CD28, CD122, 4-1BB (также известный как CD137), TIM3, OX-40 или OX40L, CD40 или CD40L, LIGHT, ICOS/ICOSL, GITR/GITRL, TIGIT, CD27, VISTA, B7H3, B7H4, HEVМ или BTLA (также известный как CD272), иммуноглобулиноподобные рецепторы клеток-киллеров (KIR) и CD47. Конкретные примеры биспецифичности включают, без ограничения, PD-L1/PD-1, PD-L1/LAG3, PD-L1/TIGIT и PD-L1/CD47.

[0081] «Опухолевый антиген» представляет собой антигенное вещество, вырабатываемое в клетках опухоли, т.е. он запускает иммунный ответ у хозяина. Опухолевые антигены полезны при идентификации клеток опухоли и являются потенциальными кандидатами для применения в терапии рака. Нормальные белки в организме не являются антигенными. Однако некоторые белки вырабатываются или сверхэкспрессируются во время онкогенеза и, таким образом, кажутся «чужеродными» для организма. Они могут включать нормальные белки, которые хорошо скрываются от



иммунной системы, белки, которые обычно вырабатываются в чрезвычайно малых количествах, белки, которые обычно вырабатываются только на определенных стадиях развития, или белки, структура которых модифицирована вследствие мутации.

**[0082]** В этой области техники известно большое количество опухолевых антигенов, и новые опухолевые антигены можно легко идентифицировать путем скрининга. Неограничивающие примеры опухолевых антигенов включают EGFR, Her2, EpCAM, CD20, CD30, CD33, CD47, CD52, CD133, CD73, CEA, gpA33, муцины, TAG-72, CIX, PSMA, фолатсвязывающий белок, GD2, GD3, GM2, VEGF, VEGFR, интегрин,  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha 5\beta 1$ , ERBB2, ERBB3, MET, IGF1R, EPHA3, TRAILR1, TRAILR2, RANKL, FAP и тенаascin.

**[0083]** Также предложены бифункциональные молекулы, которые включают не только антитело или антигенсвязывающий фрагмент. В качестве молекулы, направленно воздействующей на опухолевый антиген, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, специфичный в отношении PD-L1, такие как описаны в настоящем документе, можно объединять с иммунным цитокином или лигандом, возможно через пептидный линкер. Указанные связываемые иммунные цитокины или лиганды включают, но не ограничиваются указанными, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , CD40L, OX40L, CD27L, CD30L, 4-1BBL, LIGHT и GITRL. Такие бифункциональные молекулы могут сочетать в себе блокирующее действие в отношении иммунных контрольных точек с местной иммуномодуляцией в локализации опухоли.

#### ***Полинуклеотиды, кодирующие антитела, и способы получения антител***

**[0084]** Согласно настоящему изобретению также предложены выделенные полинуклеотиды или молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие антитела, их варианты или производные согласно настоящему изобретению. Полинуклеотиды согласно настоящему изобретению могут кодировать целые переменные области тяжелой и легкой цепи антигенсвязывающих полипептидов, их вариантов или производных в одной молекуле полинуклеотида или в отдельных молекулах полинуклеотидов. Более того, полинуклеотиды согласно настоящему изобретению могут кодировать части переменных областей тяжелой и легкой цепи антигенсвязывающих полипептидов, их вариантов или производных в одной молекуле полинуклеотида или в отдельных молекулах полинуклеотидов.

**[0085]** Способы получения антител хорошо известны в этой области техники и описаны в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации как переменные, так и константные области антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению имеют полностью человеческое происхождение. Антитела полностью человеческого происхождения могут быть получены с применением методик, описанных в

этой области техники, и как описано в настоящем документе. Например, антитела полностью человеческого происхождения к конкретному антигену могут быть получены путем введения указанного антигена трансгенному животному, которое было модифицировано для выработки таких антител в ответ на стимуляцию антигеном, но у которого были «отключены» эндогенные локусы. Типичные методики, которые можно применять для получения таких антител, описаны в патентах США: 6150584; 6458592; 6420140, полное содержание которых включено посредством ссылки.

**[0086]** В некоторых вариантах реализации полученные антитела не будут вызывать неблагоприятный иммунный ответ у животного, которого лечат, например, у человека. В одном из вариантов реализации антигенсвязывающие полипептиды, их варианты или производные согласно настоящему изобретению модифицируют для снижения их иммуногенности с применением методик, известных в этой области техники. Например, антитела можно гуманизировать, приматизировать, деиммунизировать или получать химерные антитела. Эти типы антител получают из антитела, не относящегося к человеку, как правило, антитела мыши или примата, которое сохраняет или по существу сохраняет антигенсвязывающие свойства исходного антитела, но которое менее иммуногенно у людей. Этого можно достичь различными способами, включая (а) «привитие» (grafting) целых переменных доменов, не относящихся к человеку, в константные области человека с получением химерных антител; (b) привитие по меньшей мере части одной или более определяющих комплементарность областей (CDR), не относящихся к человеку, в каркасные и константные области человека с сохранением остатков каркасной области, имеющих критическое значение, или без их сохранения; или (с) трансплантацию целых переменных доменов, не относящихся к человеку, но с «маскировкой» их участком подобным человеческому путем замены остатков поверхности. Такие способы описаны в Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57:6851-6855 (1984); Morrison *et al.*, *Adv. Immunol.* 44:65-92 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science* 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.* 25:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.* 31:169-217 (1994) и патентах США №№: 5585089, 5693761, 5693762 и 6190370, полное содержание всех из которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

**[0087]** Для снижения иммуногенности антитела можно также применять деиммунизацию. В настоящем описании термин «деиммунизация» включает изменение антитела для модификации Т-клеточных эпитопов (см., например, публикации международных заявок №№: WO/9852976 A1 и WO/0034317 A2). Например, анализируют последовательности переменных областей тяжелой цепи и переменной области легкой цепи исходного антитела и создают «карту» Т-клеточных эпитопов человека из каждой V-

области, демонстрирующую расположение эпитопов относительно определяющих комплементарность областей (CDR) и других ключевых остатков в пределах последовательности. Анализируют отдельные Т-клеточные эпитопы из карты Т-клеточных эпитопов для идентификации альтернативных замен аминокислот с низким риском изменения активности конечного антитела. Создают ряд альтернативных последовательностей вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, содержащих комбинации замен аминокислот, а затем эти последовательности вводят в ряд связывающих полипептидов. Как правило, получают от 12 до 24 вариантных антител и их тестируют для определения связывания и/или функции. Затем целые гены тяжелой и легкой цепи, содержащие модифицированные вариабельные области и константные области человека, клонируют в векторы экспрессии и полученные плазмиды вводят в линии клеток для получения полного антитела. Затем сравнивают антитела в подходящих биохимических и биологических анализах и определяют оптимальный вариант.

**[0088]** Специфичность связывания для антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению может быть определена путем проведения анализов *in vitro*, таких как иммунопреципитация, радиоиммуноанализ (RIA) или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

**[0089]** В качестве альтернативы для получения одноцепочечных антител согласно настоящему изобретению можно адаптировать способы, описанные для получения одноцепочечных антител (патент США № 4694778; Bird, *Science* 242:423-442 (1988); Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 55:5879- 5883 (1988); и Ward *et al.*, *Nature* 334:544-554 (1989)). Одноцепочечные антитела получают путем связывания фрагментов тяжелой и легкой цепи Fv-области через аминокислотный мостик, что приводит к образованию одноцепочечного пептида слияния. Можно также применять способы сборки функциональных Fv-фрагментов в *E. coli* (Skerra *et al.*, *Science* 242: 1038-1041 (1988)).

**[0090]** Примеры способов, которые можно применять для получения одноцепочечных Fv (scFv) и антител, включают те, которые описаны в патентах США №№ 4946778 и 5258498; Huston *et al.*, *Methods in Enzymology* 203:46-88 (1991); Shu *et al.*, *Proc. Natl. Sci. USA* 90:1995-1999 (1993); и Skerra *et al.*, *Science* 240:1038-1040 (1988). Для некоторых видов применения, включая применение антител у людей *in vivo* и в анализах на детектирование *in vitro*, может быть предпочтительным применение химерных, гуманизированных антител или антител человека. Химерное антитело представляет собой молекулу, в которой различные части антитела получены от животных разных видов, такую как антитела, содержащие вариабельную область, полученную из моноклонального антитела мыши, и константную область иммуноглобулина человека. Способы получения химерных антител

известны в этой области техники. См., например, Morrison, *Science* 229:1202 (1985); Oi *et al.*, *BioTechniques* 4:214 (1986); Gillies *et al.*, *J. Immunol. Methods* 125:191-202 (1989); патенты США №№ 5807715; 4816567; и 4816397, полное содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

**[0091]** Гуманизированные антитела представляют собой молекулы антител, полученные из антитела вида, не относящегося к человеку, которые связывают желаемый антиген и содержат одну или более определяющих комплементарность областей (CDR) от вида, не относящегося к человеку, и каркасные области молекулы иммуноглобулина человека. Часто каркасные остатки в каркасных областях человека заменяют соответствующим остатком из антитела-донора CDR для изменения, предпочтительно улучшения, связывания антигена. Эти замены в каркасной области идентифицируют способами, хорошо известными в этой области техники, например, путем моделирования взаимодействий остатков CDR и каркасной области для идентификации остатков каркасной области, имеющих важное значение для связывания антигена, и сравнения последовательностей для идентификации необычных остатков каркасной области в конкретных положениях. (См., например, Queen *et al.*, патент США № 5585089; Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323 (1988), полное содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки) Антитела могут быть гуманизированы с применением различных способов, известных в этой области техники, включая, например, привитие CDR (CDR-grafting) (EP 239400; публикация PCT WO 91/09967; патенты США №№ 5225539; 5530101; и 5585089), венирование или изменение поверхности (EP 592106; EP 519596; Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka *et al.*, *Protein Engineering* 7(6):805-814 (1994); Roguska. *et al.*, *Proc. Natl. Sci. USA* 91:969-973 (1994)) и рекомбинирование цепей (chain shuffling) (патент США № 5565332, полное содержание которого включено посредством ссылки).

**[0092]** Антитела полностью человеческого происхождения наиболее подходят для терапевтического лечения пациентов, представляющих собой людей. Антитела человека могут быть получены различными способами, известными в этой области техники, включая способы фагового дисплея с применением библиотек антител, полученных из последовательностей иммуноглобулинов человека. См. также патенты США №№ 4444887 и 4716111; и публикации PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 и WO 91/10741; полное содержание каждого из которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

**[0093]** Антитела человека могут быть также получены с использованием трансгенных мышей, которые неспособны экспрессировать функциональные эндогенные

иммуноглобулины, но которые могут экспрессировать гены иммуноглобулинов человека. Например, комплексы генов тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина человека можно вводить произвольно или путем гомологичной рекомбинации в эмбриональные стволовые клетки мыши. В качестве альтернативы в дополнение к генам тяжелой и легкой цепи человека в эмбриональные стволовые клетки мыши можно вводить переменную область, константную область и дополнительный сегмент человека. Гены тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина мыши можно превращать в нефункциональные отдельно или одновременно с введением локусов иммуноглобулина человека путем гомологичной рекомбинации. В частности, гомозиготная делеция JH-области препятствует эндогенной выработке антител. Модифицированные эмбриональные стволовые клетки размножают и вводят путем микроинъекции в бластоцисты с получением химерных мышей. Затем химерных мышей разводят с получением гомозиготного потомства, экспрессирующего антитела человека. Трансгенных мышей иммунизируют обычным способом выбранным антигеном, например, целым желаемым полипептидом-мишенью или его частью. Моноклональные антитела, направленные против указанного антигена, могут быть получены от иммунизированных трансгенных мышей с применением традиционной гибридомной технологии. Трансгены иммуноглобулина человека, которые несут трансгенные мыши, перестраиваются во время дифференцировки В-клеток, а затем подвергаются переключению класса и соматической мутации. Таким образом, с применением такого метода можно получать терапевтически полезные антитела IgG, IgA, IgM и IgE. Обзор этой технологии получения антител человека см. в Lonberg and Huszar *Int. Rev. Immunol.* 73:65-93 (1995). Подробное описание этой технологии получения антител человека и моноклональных антител человека, и протоколы получения таких антител см., например, в публикациях PCT WO 98/24893; WO 96/34096; WO 96/33735; патентах США №№ 5413923; 5625126; 5633425; 5569825; 5661016; 5545806; 5814318; и 5939598, полное содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки. В дополнение к этому, такие компании, как Abgenix, Inc. (Фримонт, Калифорния) и GenPharm (Сан-Хосе, Калифорния), могут быть задействованы в получении антител человека, направленных против выбранного антигена, с применением технологии, схожей с той, которая описана выше.

**[0094]** Антитела полностью человеческого происхождения, которые распознают выбранный эпитоп, могут быть также получены с применением метода, называемого «управляемой селекцией». В соответствии с этим подходом выбранное моноклональное антитело, не относящееся к человеку, например, антитело мыши используют для управления селекцией антитела полностью человеческого происхождения, распознающего

тот же эпитоп. (Jespers *et al.*, *Bio/Technology* 72:899-903 (1988). См. также патент США 5565332, полное содержание которого включено посредством ссылки.)

**[0095]** В другом варианте реализации ДНК, кодирующую желаемые моноклональные антитела, можно легко выделять и секвенировать с применением традиционных методик (например, путем использования олигонуклеотидных зондов, которые способны специфично связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антител мыши). Выделенные и субклонированные гибридомные клетки служат в качестве предпочтительного источника такой ДНК. После выделения ДНК можно помещать в векторы экспрессии, которые затем трансфицируют в прокариотические или эукариотические клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, COS-клетки обезьяны, клетки яичника китайского хомяка (СНО) или клетки миеломы, которые в других обстоятельствах не вырабатывают иммуноглобулины. В частности, выделенную ДНК (которая может быть синтетической, как описано в настоящем документе) можно использовать для клонирования последовательностей константной и варибельной области для получения антител, как описано у Newman *et al.* в патенте США № 5658570, поданном 25 января 1995 года, содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки. Это по существу включает экстракцию РНК из выбранных клеток, превращение в кДНК и амплификацию путем ПЦР с использованием Ig-специфичных праймеров. Праймеры, подходящие для этой цели, также описаны в патенте США № 5658570. Как более подробно описано ниже, трансформированные клетки, экспрессирующие желаемое антитело, можно культивировать в относительно больших количествах для обеспечения клинических и коммерческих поставок иммуноглобулина.

**[0096]** Кроме того, с применением рутинных методов рекомбинантных ДНК одна или более CDR антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению могут быть встроены в каркасные области, например, в каркасные области человека, для гуманизации антитела, не относящегося к человеку. Каркасные области могут представлять собой встречающиеся в природе или консенсусные каркасные области и предпочтительно каркасные области человека (перечень каркасных областей человека см., например, в Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 278:457-479 (1998)). Предпочтительно, полинуклеотид, полученный путем комбинирования каркасных областей и CDR, кодирует антитело, которое специфично связывается по меньшей мере с одним эпитопом желаемого полипептида, например, LIGHT. Предпочтительно, в каркасных областях можно осуществлять одну или более замен аминокислот, и предпочтительно указанные замены аминокислот улучшают связывание антитела с его антигеном. Кроме того, такие способы можно применять для осуществления аминокислотных замен или делеций одного или более

остатков цистеина варибельной области, участвующих во внутрипочечной дисульфидной связи, с получением молекул антител, не содержащих одной или более внутрипочечных дисульфидных связей. Настоящее изобретение включает другие изменения полинуклеотида, и они находятся в рамках компетенции специалиста в этой области техники.

**[0097]** В дополнение к этому можно применять методы, разработанные для получения «химерных антител» (Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*:851-855 (1984); Neuberger *et al.*, *Nature* 372:604-608 (1984); Takeda *et al.*, *Nature* 314:452-454 (1985)) путем сплайсинга генов из молекулы антитела мыши с подходящей специфичностью к антигену наряду с генами из молекулы антитела человека с подходящей биологической активностью. В настоящем описании химерное антитело представляет собой молекулу, в которой различные части получены от животных разных видов, такую как молекулы, содержащие варибельную область, полученную из моноклонального антитела мыши, и константную область иммуноглобулина человека.

**[0098]** Еще один высокоэффективный способ получения рекомбинантных антител описан Newman, *Biotechnology* 10: 1455-1460 (1992). В частности, этот способ позволяет получать приматизированные антитела, которые содержат варибельные домены обезьяны и константные последовательности человека. Полное содержание этого источника включено в настоящее описание посредством ссылки. Более того, этот способ также описан в принадлежащих одному и тому же правообладателю патентах США №№ 5658570, 5693780 и 5756096, содержание каждого из которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

**[0099]** В качестве альтернативы антителопродуцирующие линии клеток можно отбирать и культивировать с применением методов, хорошо известных специалисту. Такие методы описаны в различных инструкциях по проведению лабораторных работ и основных публикациях. В этом отношении методы, подходящие для применения согласно настоящему изобретению, как описано ниже, описаны в *Current Protocols in Immunology*, Coligan *et al.*, Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991), полное содержание которого, включая приложения, включено в настоящее описание посредством ссылки.

**[00100]** Кроме того, для введения мутаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело согласно настоящему изобретению, можно применять стандартные методы, известные специалисту в этой области техники, включая, но не ограничиваясь указанными, сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредуемый мутагенез, которые приводят к заменам аминокислот. Предпочтительно, варианты (включая производные)

кодируют менее 50 замен аминокислот, менее 40 замен аминокислот, менее 30 замен аминокислот, менее 25 замен аминокислот, менее 20 замен аминокислот, менее 15 замен аминокислот, менее 10 замен аминокислот, менее 5 замен аминокислот, менее 4 замен аминокислот, менее 3 замен аминокислот или менее 2 замен аминокислот относительно эталонной вариабельной области тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, вариабельной области легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 или CDR-L3. В качестве альтернативы мутации можно вводить произвольно по всей или по части кодирующей последовательности, например, путем насыщающего мутагенеза, и полученные мутанты можно подвергать скринингу на предмет биологической активности для идентификации мутантов, которые сохраняют активность.

**[00101]** Согласно настоящему изобретению также предложены фармацевтические композиции. Такие композиции содержат эффективное количество антитела и приемлемый носитель. В некоторых вариантах реализации композиция дополнительно содержит второй противораковый агент (например, ингибитор иммунных контрольных точек).

**[00102]** В конкретном варианте реализации термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата, или перечисленный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и, в частности, у людей. Более того, «фармацевтически приемлемый носитель» в целом представляет собой нетоксичный твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующее вещество или вспомогательное вещество для состава любого типа.

**[00103]** Термин «носитель» относится к разбавителю, адъюванту, вспомогательному веществу или наполнителю, совместно с которым вводят лекарственное средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая масла минерального, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Вода является предпочтительным носителем, когда фармацевтическую композицию вводят внутривенно. В качестве жидких носителей, в частности, для растворов для инъекций можно также использовать солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина. Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т.п. Композиция при необходимости может также содержать незначительные количества смачивающих агентов или эмульгаторов, или рН буферных агентов, таких как ацетаты, цитраты или фосфаты. Также предусмотрены



антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Эти композиции могут иметь форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и т.п. Композиция может быть представлена в виде суппозитория с традиционными связующими веществами и носителями, такими как триглицериды. Состав для перорального введения может содержать стандартные носители, такие как маннитол, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния и т.д. фармацевтической степени чистоты. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны E. W. Martin в Remington's Pharmaceutical Sciences, содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки. Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество антигенсвязывающего полипептида, предпочтительно в очищенной форме, совместно с подходящим количеством носителя для получения формы для надлежащего введения пациенту. Состав должен соответствовать способу введения. Препарат для парентерального введения может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или изготовленные из стекла или пластика флаконы, содержащие несколько доз.

**[00104]** В одном из вариантов реализации композицию представляют в соответствии с рутинными методиками в виде фармацевтической композиции, подходящей для внутривенного введения людям. Как правило, композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости композиция может также содержать солюбилизующий агент и местный анестетик, такой как лигнокаин, для облегчения боли в месте инъекции. Как правило, ингредиенты поставляют либо по отдельности, либо в смеси друг с другом в единичной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или не содержащего воды концентрата в герметично закрытой емкости, такой как ампула или саше, на которой указано количество активного агента. Если композиция предназначена для введения путем инфузии, ее можно дозировать с помощью инфузионного флакона, содержащего стерильную воду или солевой раствор фармацевтической степени чистоты. Если композицию вводят путем инъекции, может быть предоставлена ампула со стерильной водой для инъекций или солевым раствором для того, чтобы ингредиенты можно было смешивать перед введением.

**[00105]** Соединения согласно настоящему изобретению могут быть включены в состав в виде нейтральных или солевых форм. Фармацевтически приемлемые соли включают

соли, образованные анионами, такими как полученные из хлористоводородной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т.д., и соли, образованные катионами, такими как полученные из натрия, калия, аммония, кальция, гидроксидов железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.д.

## ПРИМЕРЫ

### Пример 1: Анализ взаимодействий на интерфейсе Ск/СН1 для четырех Fab-фрагментов

**[00106]** В этом примере анализировали несколько Fab-фрагментов антител в отношении взаимодействий на интерфейсе Ск/СН1.

*Структура 1: Анализ взаимодействий на интерфейсе для Ск и СН1 Fab-фрагмента 1F8*

**[00107]** 1F8 представляет собой Fab-молекулу, полученную из антитела, специфичного к CD47 человека. Анализ сложной кристаллической структуры CD47 с Fab-фрагментом 1F8 анти-CD47 проводили с разрешением 3,1Å в 2017 году (легкая цепь содержала 219 аминокислот, при этом Ск содержал аминокислоты 114-219; тяжелая цепь содержала 220 аминокислот, при этом СН содержал аминокислоты 119-220).

**[00108]** На интерфейсе между Ск- и СН1-доменами этого Fab-фрагмента всего присутствуют 32 остатка из СН-домена и 35 остатков из Ск-домена. 1F8 содержит непрерывные остатки между Ser14 и Gly20 в СН-доме. Присутствует еще одна водородная связь, образованная между атомом кислорода Lys16 основной цепи из СН-фрагмента и остатком Lys100 из Ск-фрагмента по сравнению с 4NYL (см. структуру 4 ниже). Гидрофобные взаимодействия схожи с другими структурами, представленными ниже.

#### Водородные связи (отсечение расстояния: 3,5Å)

Ск			СН1			Расстояние (Å)
Положение	Остаток	Название атома	Положение	Остаток	Название атома	
16	LYS	O	100	LYS	NZ	3,4
30	LYS	NZ	24	SER	OG	2,7
51	HIS	ND1	30	ASN	OD1	3,3
54	PRO	O	55	SER	OG	2,7
57	LEU	O	53	GLN	NE2	3,4
102	SER	OG	106	GLU	O	2,6

#### Примечания:

1. HD между СН-Lys30 и Ser24 может образовываться в других трех структурах, пока вращается NZ Lys30.
2. Дополнительные HD между СН-Lys16/СК-Lys100 и СН-Ser102/СК-Glu106 образуются из-за различия в последовательности по сравнению с другими 3 базами данных структуры белков

(pdb).

### Солевые мостики между Ск и СН1 1F8

СН1			Ск			Расстояние (Å)
Положение	Остаток	Название атома	Положение	Остаток	Название атома	
96	LYS	NZ	16	GLU	OE2	3,1
101	LYS	NZ	15	ASP	OD2	3,8

### Гидрофобный интерфейс

СН1		Ск		Примечания
Положение	Остаток	Положение	Остаток	
9	PHE	17	GLN	«Сэндвич», больше похоже на ван-дер-ваальсовы
11	LEU	11, 26	PHE, VAL	
12	ALA	11	PHE	
24	ALA	9, 11	PHE	
53	PHE	28, 68, 69	LEU, LEU, SER	
68	VAL	28	LEU	

\* В этой таблице исключены гидрофобные контакты, вовлеченные в водородные связи, а также солевые связи

[00109] Анализ отклонения свободной энергии позволил определить, что некоторые остатки в СН1 1F8 демонстрируют более сильные взаимодействия с остатками Ск (см. первые 10 остатков в таблице ниже, выделены жирным шрифтом).

### Формирующие интерфейс остатки в СН1 1F8:

Положение	Остаток	Связь	ASA	BSA	ДельтаG	Абс дельтаG
53	<b>PHE</b>		104,91	102,42	1,64	1,64
9	<b>PHE</b>		95,13	73,47	1,18	1,18
11	<b>LEU</b>		63,14	60,63	0,97	0,97
56	<b>VAL</b>		97,59	60,26	0,96	0,96
30	LYS	H	74,1	57,96	-0,85	0,85
96	LYS	S	71,12	24,42	-0,71	0,71
28	<b>LEU</b>		48,35	42,65	0,68	0,68
24	<b>ALA</b>		41,8	41,64	0,62	0,62
68	<b>VAL</b>		41,46	36,31	0,58	0,58
54	<b>PRO</b>	H	118,8	51,46	0,53	0,53
16	LYS	H	190,06	97,08	0,44	0,44
19	SER		87,49	29,98	0,37	0,37
10	PRO		67,03	38,95	0,23	0,23
70	THR	H	74,01	32,39	-0,16	0,16
57	LEU	H	101,62	7,97	-0,09	0,09
51	HIS	H	125,59	86,42	0,08	0,08
58	GLN		49,39	19,38	0,08	0,08

17	SER	H	44,25	44,25	0,06	0,06
18	THR	H	54,47	19,11	-0,06	0,06
22	THR		61,97	7,01	-0,06	0,06
12	ALA		72,88	29,29	0,05	0,05
66	SER		30,01	25,56	-0,05	0,05
52	THR		60,18	4,28	-0,04	0,04
59	SER		129,9	3,35	-0,04	0,04
25	LEU		3,79	2,96	0,04	0,04
23	ALA		2,05	1,88	0,03	0,03
8	VAL		11,3	1,81	-0,02	0,02
65	LEU		13,88	1,01	0,02	0,02
14	SER		52,86	6,52	-0,01	0,01
15	SER		98,56	0,61	-0,01	0,01

Связь: вид связи, если образуется водородная связь или солевой мостик, Н: водородная связь, S: солевой мостик

ASA: доступная площадь поверхности

BSA: площадь скрытой поверхности

ДельтаG: изменение энергии, положительное подразумевает более гидрофобное взаимодействие, тогда как отрицательное указывает на более гидрофильное взаимодействие

Абс дельтаG: абсолютное значение дельтаG, сортировка в таблице выполнена по этому критерию

Остатки (выделены жирным шрифтом) с изменением дельтаG выше 0,5 можно рассматривать как остатки, которые вносят большой вклад в стабилизацию белка.

**[00110]** В Ск-домене во взаимодействия вовлечены, вероятно, семь остатков.

#### Формирующие интерфейс остатки в Ск 1F8:

Положение	Остаток	Связь	ASA	BSA	ДельтаG	Абс дельтаG
<b>11</b>	<b>PHE</b>		<b>103,34</b>	<b>103,03</b>	<b>1,65</b>	<b>1,65</b>
<b>9</b>	<b>PHE</b>		<b>85,86</b>	<b>83,98</b>	<b>1,34</b>	<b>1,34</b>
<b>100</b>	<b>LYS</b>	<b>H</b>	<b>86,5</b>	<b>41,41</b>	<b>-1,06</b>	<b>1,06</b>
<b>57</b>	<b>THR</b>		<b>76,88</b>	<b>61,43</b>	<b>0,93</b>	<b>0,93</b>
<b>28</b>	<b>LEU</b>		<b>47,22</b>	<b>45,38</b>	<b>0,73</b>	<b>0,73</b>
<b>26</b>	<b>VAL</b>		<b>42,67</b>	<b>42,67</b>	<b>0,68</b>	<b>0,68</b>
<b>53</b>	<b>GLN</b>	<b>H</b>	<b>153,38</b>	<b>81,8</b>	<b>-0,65</b>	<b>0,65</b>
14	SER		63,01	48,31	0,47	0,47
30	ASN	H	46,04	36,92	-0,44	0,44
102	PHE		43,9	22,09	0,35	0,35
12	PRO		78,85	40,42	0,31	0,31
16	GLU	S	132,97	48,56	-0,31	0,31
101	SER		64,98	27,71	-0,31	0,31
31	ASN		71,04	16,15	-0,25	0,25
73	THR	H	78,11	22,7	0,18	0,18
17	GLN		46,63	45,77	0,17	0,17
60	ASP		67,72	10,4	0,14	0,14
67	SER		21,05	20,24	0,13	0,13
69	SER		30,67	27,47	0,13	0,13

7	SER		56,42	8,61	0,12	0,12
54	GLU		92,77	11,21	-0,11	0,11
56	VAL		43,54	12,76	-0,1	0,1
71	THR		39,29	14,82	0,09	0,09
10	ILE	H	28,88	27,62	-0,07	0,07
58	GLU		156,59	7,29	0,05	0,05
55	SER	H	73,31	57,53	-0,04	0,04
24	SER	H	30,01	29,28	0,03	0,03
8	VAL		9,41	1,5	-0,02	0,02
68	LEU		7,95	1,41	0,02	0,02
20	SER		98,75	8,4	-0,01	0,01
22	THR		59,56	11,35	-0,01	0,01
103	ASN		47,6	0,87	-0,01	0,01

Связь: вид связи, если образуется водородная связь или солевой мостик, Н: водородная связь, S: солевой мостик

ASA: доступная площадь поверхности

BSA: площадь скрытой поверхности

ДельтаG: изменение энергии, положительное подразумевает более гидрофобное взаимодействие, тогда как отрицательное указывает на более гидрофильное взаимодействие

Абс дельтаG: абсолютное значение дельтаG, сортировка в таблице выполнена по этому критерию.

Остатки (выделены жирным шрифтом) с изменением дельтаG выше 0,5 можно рассматривать как остатки, которые вносят больший вклад в стабилизацию белка.

### *Структура 2: Анализ взаимодействий на интерфейсе для Ск и СН1 1CZ8*

**[00111]** 1CZ8 (PDB ID **1CZ8**) представляет собой Fab-молекулу, полученную из антитела, специфичного к VEGF. Анализ сложной кристаллической структуры VEGF и Fab проводили с разрешением 2,4Å в 2000 году.

**[00112]** Аминокислотные остатки образовывали три антипараллельных бета-складчатых слоя в СН-домене и четыре антипараллельных бета-складчатых слоя в Ск-домене. Эти бета-складчатые слои формировали конформацию «лицом к лицу» на интерфейсе. На интерфейсе между Ск- и СН1-доменами этого Fab-фрагмента всего присутствуют 28 остатков из СН-домена и 30 остатков из Ск-домена. Между Ск- и СН1-доменами присутствуют три водородные связи. Например, в 1CZ8 в СН-домене остаток His 51 и атомы кислорода Pro54 и Leu57 основной цепи образовывали эти три водородные связи с остатками Asn31, Ser55 и Gln53 соответственно в Ск-домене. Эти водородные связи расположены в одной части интерфейса.

**[00113]** Гидрофобные взаимодействия в основном локализованы в центральной и другой части интерфейса между остатками Phe9, Leu11, Phe53, Val68 СН-домена и остатками Gln17, Phe11, Val26, Phe69 и Val28 Ск-домена. Два солевых мостика образовывались между С-концом остатков Lys96 и Lys101 СН-домена и остатком Asp15 и Glu16 Ск-домена для

стабилизации структуры комплекса СН и Ск в другой части интерфейса (**фиг.1**; остатки, вовлеченные в водородную связь, окрашены в розовый цвет; солевой мостик в желтый цвет; остатки, обеспечивающие гидрофобные взаимодействия, представляют собой палочки, окрашенные в синий или зеленый цвет).

#### Водородные связи (отсечение расстояния: 3,5Å)

СН1			Ск			Расстояние (Å)
Положение	Остаток	Название атома	Положение	Остаток	Название атома	
51	HIS	NE2	31	ASN	OD1	2,86
54	PRO	O	55	SER	OG	2,6
57	LEU	O	53	GLN	NE2	2,9
Опосредованное водой образование водородной связи						
10	PRO	O	12	PRO	O	
58	GLN	OE1	24	SER	OG	
54	PRO	O	71	THR	OG1	

#### Солевые мостики между СН и Ск

СН1			Ск			Расстояние (Å)
Положение	Остаток	Название атома	Положение	Остаток	Название атома	
96	LYS	NZ	16	GLU*	OE1	3,0
101	LYS	NZ	15	ASP*	OD1	2,8

#### Гидрофобный интерфейс (отсечение расстояния: 4Å)

СН1		Ск		Примечания
Положение	Остаток	Положение	Остаток	
9	PHE	17	GLN	
11	LEU	11, 26	PHE, VAL	4Å от атома Ca Leu15
12	ALA	11	PHE	
24	ALA	11	PHE	Вытеснен
53	PHE	28, 69	LEU, SER	«Сэндвич»
68	VAL	28	LEU	«Сэндвич»

#### 5 остатков на интерфейсе, имеющих наибольшее значение для взаимодействия Ск и

#### СН1

СН1		Ск	
Положение	Остаток	Положение	Остаток
51	HIS	31	ASN
57	LEU	53	GLN
9	PHE	17	GLN
53	PHE	69	SER
11	LEU	11, 26	PHE, VAL

**Примечание:** исключены остатки, образующие солевые мостики

**[00114]** Анализ отклонения свободной энергии позволил определить, что некоторые остатки в СН1 1cz8 демонстрируют более сильные взаимодействия с остатками Ск (см. первые 9 остатков в таблице ниже, выделены жирным шрифтом).

**Формирующие интерфейс остатки: СН1 1cz8**

Положение	Остаток	связь	ASA	BSA	ДельтаG	Абс дельтаG
53	<b>PHE</b>		<b>103,02</b>	<b>99,71</b>	<b>1,6</b>	<b>1,6</b>
9	<b>PHE</b>		<b>96,3</b>	<b>77,27</b>	<b>1,24</b>	<b>1,24</b>
11	<b>LEU</b>		<b>64,71</b>	<b>61,37</b>	<b>0,98</b>	<b>0,98</b>
56	<b>VAL</b>		<b>93,45</b>	<b>56,39</b>	<b>0,9</b>	<b>0,9</b>
28	<b>LEU</b>		<b>48,79</b>	<b>44,61</b>	<b>0,71</b>	<b>0,71</b>
51	<b>HIS</b>	<b>H</b>	<b>114,24</b>	<b>93,31</b>	<b>0,68</b>	<b>0,68</b>
54	<b>PRO</b>	<b>H</b>	<b>120,4</b>	<b>53,11</b>	<b>0,59</b>	<b>0,59</b>
68	<b>VAL</b>		<b>35,98</b>	<b>34,81</b>	<b>0,56</b>	<b>0,56</b>
24	<b>ALA</b>		<b>53,89</b>	<b>51,35</b>	<b>0,55</b>	<b>0,55</b>
70	THR		64,58	33,59	0,43	0,43
96	LYS	S	63,68	16,19	-0,39	0,39
101	LYS	S	231,91	46,46	-0,39	0,39
30	LYS		62,59	47,59	0,29	0,29
10	PRO		66,28	37,49	0,26	0,26
12	ALA		47,32	20,55	-0,2	0,2
57	LEU	H	101,85	12,03	-0,14	0,14
66	SER		28,08	23,48	0,13	0,13
58	GLN		41,61	13,28	0,11	0,11
8	VAL		16,24	6,24	-0,07	0,07
25	LEU		3,82	3,49	0,06	0,06
23	ALA		14,88	3,31	0,05	0,05
59	SER		132,12	3,5	-0,04	0,04
52	THR		59,64	4,29	-0,03	0,03
22	THR		97,5	16,73	0,02	0,02
64	SER		11,46	1,84	-0,02	0,02
13	PRO		5,85	0,5	0,01	0,01
14	SER		149,42	0,94	0,01	0,01

Связь: вид связи, если образуется водородная связь или солевой мостик, H: водородная связь, S: солевой мостик

ASA: доступная площадь поверхности

BSA: площадь скрытой поверхности

ДельтаG: изменение энергии, положительное подразумевает более гидрофобное взаимодействие, тогда как отрицательное указывает на более гидрофильное взаимодействие

Абс дельтаG: абсолютное значение дельтаG, сортировка в таблице выполнена по этому критерию.

Остатки (выделены жирным шрифтом) с изменением дельтаG выше 0,5 можно рассматривать как остатки, которые вносят больший вклад в стабилизацию белка.

**[00115]** В Ск-домене во взаимодействия вовлечены, вероятно, пять остатков.

**Формирующие интерфейс остатки: Ск 1cz8**

Положение	Остаток	связь	ASA	BSA	ДельтаG	Абс дельтаG
11	<b>PHE</b>		<b>100,45</b>	<b>95,29</b>	<b>1,52</b>	<b>1,52</b>

9	<b>PHE</b>		<b>99,99</b>	<b>59,32</b>	<b>0,95</b>	<b>0,95</b>
28	<b>LEU</b>		<b>48,88</b>	<b>48,38</b>	<b>0,77</b>	<b>0,77</b>
26	<b>VAL</b>		<b>46,36</b>	<b>45,71</b>	<b>0,73</b>	<b>0,73</b>
53	<b>GLN</b>	<b>H</b>	<b>152,03</b>	<b>80,54</b>	<b>-0,63</b>	<b>0,63</b>
14	SER		62,19	48,96	0,49	0,49
30	ASN		45,99	39,43	-0,49	0,49
16	GLU	S	133,88	61,31	-0,46	0,46
15	ASP	S	118,39	37,99	-0,36	0,36
69	SER		37,96	30,45	0,3	0,3
31	ASN	H	71	17,38	-0,27	0,27
67	SER		20,55	20,55	0,18	0,18
17	GLN		55,44	53,37	0,16	0,16
56	VAL		64,32	17,9	-0,14	0,14
71	THR		44,12	16,45	0,12	0,12
60	ASP		61,58	15,19	-0,11	0,11
54	GLU		92,25	12,17	-0,1	0,1
22	THR		65,41	8,27	0,07	0,07
57	THR		59,04	44,28	-0,07	0,07
68	LEU		7,25	2,72	0,04	0,04
20	SER		84,08	5,75	-0,02	0,02
58	GLU		146,27	4,53	0,02	0,02
10	ILE		25,87	0,86	-0,01	0,01
13	PRO		12,65	1,66	-0,01	0,01
24	SER		31,09	30,1	0,01	0,01
55	SER	H	71,35	56,44	-0,01	0,01
73	THR		81,21	12,51	-0,01	0,01

Связь: вид связи, если образуется водородная связь или солевой мостик, Н: водородная связь, S: солевой мостик

ASA: доступная площадь поверхности

BSA: площадь скрытой поверхности

ДельтаG: изменение энергии, положительное подразумевает более гидрофобное взаимодействие, тогда как отрицательное указывает на более гидрофильное взаимодействие

Абс дельтаG: абсолютное значение дельтаG, сортировка в таблице выполнена по этому критерию.

Остатки (выделены жирным шрифтом) с изменением дельтаG выше 0,5 можно рассматривать как остатки, которые вносят больший вклад в стабилизацию белка.

### Структура 3: Анализ взаимодействий на интерфейсе для Ск и СН1 1L7I

**[00116]** 1L7I представляет собой известную Fab-молекулу (PDB ID: 1L7I), направленно воздействующую на ErbB2. Кристаллическую структуру этого Fab2C4 анти-ErbB2 определяли при 1,8Å в 2002 году.

**[00117]** На интерфейсе между Ск- и СН1-доменом этого Fab-фрагмента (PDB ID 1L7i) всего присутствуют 33 остатка из СН-домена и 35 остатков из Ск-домена.

**[00118]** Водородные связи 1L7i (отсечение расстояния: 3,5Å)

Ск	СН1	Расстояние (Å)
----	-----	----------------



Положение	Остаток	Название атома	Положение	Остаток	Название атома	
16	LYS	O	10	ILE	N	3,16
16	LYS	NZ	101	SER	O	2,99
51	HIS	ND1	31	ASN	OD1	3,2
54	PRO	O	55	SER	OG	2,7
57	LEU	O	53	GLN	NE2	2,9
Опосредованное водой образование водородной связи						
10	PRO	O	12	PRO	O	
12	ALA	O	10	ILE	O	
54	PRO	O	71	THR	OG1	

### Солевые мостики между СК и СН 1L7i

СН1			Ск			Расстояние (Å)
Положение	Остаток	Название атома	Положение	Остаток	Название атома	
96	LYS	NZ	16	GLU	OE1, OE2	3,4-2,7

**Примечание:** С-концевые остатки Cys 103 в СН и Cys 107 в СК образовывали дисульфидный мостик, который разрывал солевой мостик между остатком Lys101 в СН и остатком Asp15 в Ск, который наблюдали в других структурах.

### Гидрофобный интерфейс 1L7i

Ск			СН1			Расстояние (Å)
Положение	Остаток	Название атома	Положение	Остаток	Название атома	
16	LYS	O	100	LYS	NZ	3,4
30	LYS	NZ	24	SER	OG	2,7
51	HIS	ND1	30	ASN	OD1	3,3
54	PRO	O	55	SER	OG	2,7
57	LEU	O	53	GLN	NE2	3,4
102	SER	OG	106	GLU	O	2,6

**[00119]** Анализ отклонения свободной энергии позволил определить, что некоторые остатки в СН1 1L7i демонстрируют более сильные взаимодействия с остатками Ск (см. первые 12 остатков в таблице ниже, выделены жирным шрифтом).

### Формирующие интерфейс остатки: СН1 1L7i

Положение	Остаток	связь	ASA	BSA	ДельтаG	Абс дельтаG
103	CYS		113,02	79,88	2,31	2,31
53	PHE		104,25	101,74	1,63	1,63
9	PHE		99,04	80,13	1,28	1,28
101	LYS	S	141,67	60,98	-1,2	1,2
56	VAL		92,31	59,34	0,95	0,95
11	LEU		61,26	57,09	0,91	0,91

54	PRO	H	116,04	53,67	0,73	0,73
28	LEU		50,04	45,19	0,72	0,72
17	SER		37,12	37,12	0,55	0,55
68	VAL		34,63	33,97	0,54	0,54
24	ALA		33,93	33,93	0,52	0,52
96	LYS	S	69,62	16,57	-0,52	0,52
70	THR		59,2	34,05	0,42	0,42
10	PRO		57,58	41,55	0,33	0,33
30	LYS		64,74	49,18	0,29	0,29
58	GLN		48,94	23,52	0,26	0,26
16	LYS	H	154,48	98,09	0,21	0,21
12	ALA		37,27	23,91	-0,17	0,17
66	SER		26,68	23,26	0,14	0,14
22	THR		61,32	9,4	0,13	0,13
102	SER		106,39	12,64	-0,12	0,12
57	LEU		109,6	10,1	-0,11	0,11
18	THR		47,02	7,72	-0,09	0,09
19	SER		89,59	40,33	-0,07	0,07
25	LEU		4,95	4,61	0,07	0,07
15	SER		83,74	3,93	-0,04	0,04
14	SER		15,02	4,4	-0,03	0,03
51	HIS		111,16	79,43	0,02	0,02
52	THR		62,51	3,83	-0,02	0,02
23	ALA		0,33	0,33	0,01	0,01
59	SER		127,52	1,31	-0,01	0,01
64	SER		9,13	0,61	-0,01	0,01

Связь: вид связи, если образуется водородная связь или солевой мостик, Н: водородная связь, S: солевой мостик

ASA: доступная площадь поверхности

BSA: площадь скрытой поверхности

ДельтаG: изменение энергии, положительное подразумевает более гидрофобное взаимодействие, тогда как отрицательное указывает на более гидрофильное взаимодействие

Абс дельтаG: абсолютное значение дельтаG, сортировка в таблице выполнена по этому критерию.

Остатки (выделены жирным шрифтом) с изменением дельтаG выше 0,5 можно рассматривать как остатки, которые вносят больший вклад в стабилизацию белка.

**[00120]** В Ск-домене во взаимодействия вовлечены, вероятно, девять остатков.

**Формирующие интерфейс остатки: Ск 1L7i**

Положение	Остаток	связь	ASA	BSA	ДельтаG	Абс дельтаG
-----------	---------	-------	-----	-----	---------	-------------

11	PHE		105,85	105,73	1,68	1,68
9	PHE		89,04	88,03	1,41	1,41
100	LYS	H	85,84	42,05	-1,08	1,08
57	THR		74,5	58,15	0,89	0,89
107	CYS	S	101,84	64,95	0,89	0,89
28	LEU		48,03	47,86	0,77	0,77
26	VAL		44,53	44,19	0,71	0,71
53	GLN		151,85	79,95	-0,58	0,58
12	PRO		56,22	48,12	0,54	0,54
30	ASN		43,79	36,72	-0,44	0,44
16	GLU	S	108,76	56,23	-0,4	0,4
14	SER		53,87	41,73	0,39	0,39
69	SER		41	33,43	0,33	0,33
31	ASN		78,35	17,4	-0,27	0,27
101	SER		57,64	22,68	-0,26	0,26
102	PHE		21,99	16,51	0,26	0,26
73	THR		63,23	17,38	0,15	0,15
60	ASP		61,68	11,2	-0,14	0,14
7	SER		48,66	8,03	0,13	0,13
67	SER		16,14	16,14	0,13	0,13
56	VAL		37,56	12,43	-0,12	0,12
106	GLU		136	18,91	-0,12	0,12
55	SER	H	69,61	59,4	0,11	0,11
13	PRO		14,76	6,87	-0,08	0,08
17	GLN		49,85	48,28	0,08	0,08
24	SER		24,37	22,04	0,08	0,08
54	GLU		96,84	10,59	-0,07	0,07
8	VAL		15,41	5,63	-0,06	0,06
71	THR		41,6	14,33	0,06	0,06
58	GLU		156,39	9,76	0,04	0,04
10	ILE	H	31,71	31,59	0,03	0,03
15	ASP		107,21	9,87	0,03	0,03
68	LEU		4,61	1,93	0,03	0,03
22	THR		52,89	8,19	0,02	0,02
20	SER		84,54	13,16	0,01	0,01

Связь: вид связи, если образуется водородная связь или солевой мостик, Н: водородная связь, S: солевой мостик

ASA: доступная площадь поверхности

BSA: площадь скрытой поверхности

ДельтаG: изменение энергии, положительное подразумевает более гидрофобное взаимодействие, тогда как отрицательное указывает на более гидрофильное взаимодействие

Абс дельтаG: абсолютное значение дельтаG, сортировка в таблице выполнена по этому критерию.

Остатки (выделены жирным шрифтом) с изменением дельтаG выше 0,5 можно рассматривать как остатки, которые вносят больший вклад в стабилизацию белка.

*Структура 4: Анализ взаимодействий на интерфейсе для Ск и CH1 4NYL*

**[00121]** Четвертая исследуемая структура представляла собой 4NYL, известную Fab-молекулу (PDB ID: 4NYL), направленно воздействующую на TNF $\alpha$ . Кристаллическую структуру FAB-фрагмента адалимумаба определяли при 2,8Å в 2014 году (определена с относительно высоким значением Rfree (Rfree=35,8%/R=27,5), что означает, что указанная структура не подходит для подробного анализа). *Адалимумаб* представляет собой антитело к TNF $\alpha$ , применяемое для лечения пациентов с ревматоидным артритом, псориатическим артритом и анкилозирующим спондилитом, и у детей с ювенильным идиопатическим артритом. На интерфейсе между C $\kappa$ - и CH1-доменом Fab-фрагмента адалимумаба (PDB ID 4NYL) всего присутствуют 24 остатка из CH1-домена и 28 остатков из C $\kappa$ -домена.

**[00122]** 4NYL демонстрирует такую же водородную связь и гидрофобное взаимодействие, что и в 1CZ8. Из-за отсутствия C-концевых остатков Ch между C-концом остатка Lys96 CH и остатком Glu15 CK образовывался только один солевой мостик.

#### Водородные связи 4NYL (отсечение расстояния: 3,5Å)

CH1			C $\kappa$ +V $\kappa$			Расстояние (Å)
Положение	Остаток	Название атома	Положение	Остаток	Название атома	
51	HIS	NE2	30	ASN	OD1	3,22
54	PRO	O	55	SER	OG	2,7
57	LEU	O	53	GLN	OE1	2,97

Примечание: из-за предела разрешающей способности не обнаруживали опосредованных водой водородных связей.

#### Солевые мостики между CK и CH 4NYL

CH1			C $\kappa$			Расстояние (Å)
Положение	Остаток	Название атома	Положение	Остаток	Название атома	
96	LYS	NZ	16	GLU	OE1, OE2	3,4-2,7

Примечание: поскольку в 4NYL отсутствуют C-концевые остатки 100-103, то отсутствует солевой мостик между CH-Lys101 и CK-Asp15.

#### Гидрофобный интерфейс 4NYL

CH1		C $\kappa$		Примечания
Положение	Остаток	Положение	Остаток	
9	PHE	17	GLN	«Сэндвич»
11	LEU	11, 26	PHE, VAL	«Сэндвич»
12	ALA	11	PHE	вытеснен
24	ALA	9, 11, 28	PHE, LEU, LEU	«Сэндвич»
68	VAL	28	LEU	«Сэндвич»

[00123] Анализ отклонения свободной энергии позволил определить, что некоторые остатки в CH1 4NYL демонстрируют более сильные взаимодействия с остатками Ск (см. первые девять остатков в таблице ниже, выделены жирным шрифтом).

#### Формирующие интерфейс остатки: CH1 4NYL

Положение	Остаток	связь	ASA	BSA	ДельтаG	Абс дельтаG
<b>53</b>	<b>PHE</b>		<b>96,83</b>	<b>95,9</b>	<b>1,53</b>	<b>1,53</b>
<b>9</b>	<b>PHE</b>		<b>97,57</b>	<b>74,98</b>	<b>1,2</b>	<b>1,2</b>
<b>11</b>	<b>LEU</b>		<b>67,89</b>	<b>65,22</b>	<b>1,04</b>	<b>1,04</b>
<b>56</b>	<b>VAL</b>		<b>102,16</b>	<b>64,24</b>	<b>1,03</b>	<b>1,03</b>
<b>28</b>	<b>LEU</b>		<b>56,92</b>	<b>51,23</b>	<b>0,82</b>	<b>0,82</b>
<b>54</b>	<b>PRO</b>	<b>H</b>	<b>117,72</b>	<b>48,38</b>	<b>0,65</b>	<b>0,65</b>
<b>68</b>	<b>VAL</b>		<b>38,86</b>	<b>38,35</b>	<b>0,61</b>	<b>0,61</b>
<b>24</b>	<b>ALA</b>		<b>56,65</b>	<b>54,38</b>	<b>0,59</b>	<b>0,59</b>
<b>51</b>	<b>HIS</b>	<b>H</b>	<b>109,04</b>	<b>76,51</b>	<b>0,54</b>	<b>0,54</b>
70	THR		65,96	30,78	0,47	0,47
12	ALA		65,59	34,43	-0,27	0,27
10	PRO		58,21	35,55	0,21	0,21
96	LYS		71,02	8,03	0,13	0,13
13	PRO		110,53	7,16	0,11	0,11
58	GLN		45,51	21,8	0,11	0,11
52	THR		68,63	7,32	-0,08	0,08
57	LEU	<b>H</b>	105,07	6,99	-0,08	0,08
25	LEU		10,31	4,61	0,07	0,07
66	SER		27,04	21,25	0,07	0,07
23	ALA		20,19	3,62	0,06	0,06
22	THR		99,8	17,73	0,04	0,04
59	SER		129,22	4,43	-0,04	0,04
30	LYS		68,02	48,93	-0,03	0,03
64	SER		15,79	1,32	-0,01	0,01

Связь: вид связи, если образуется водородная связь или солевой мостик, H: водородная связь, S: солевой мостик

ASA: доступная площадь поверхности

BSA: площадь скрытой поверхности

ДельтаG: изменение энергии, положительное подразумевает более гидрофобное взаимодействие, тогда как отрицательное указывает на более гидрофильное взаимодействие

Абс дельтаG: абсолютное значение дельтаG, сортировка в таблице выполнена по этому критерию.

Остатки (выделены жирным шрифтом) с изменением дельтаG выше 0,5 можно рассматривать как остатки, которые вносят больший вклад в стабилизацию белка.

[00124] В Ск-домене во взаимодействия вовлечены, вероятно, семь остатков.

#### Формирующие интерфейс остатки: Ск 4NYL

Положение	Остаток	связь	ASA	BSA	ДельтаG	Абс дельтаG
<b>11</b>	<b>PHE</b>		<b>94,4</b>	<b>92,85</b>	<b>1,49</b>	<b>1,49</b>
<b>9</b>	<b>PHE</b>		<b>98,42</b>	<b>57,04</b>	<b>0,91</b>	<b>0,91</b>
<b>28</b>	<b>LEU</b>		<b>53,03</b>	<b>53,03</b>	<b>0,85</b>	<b>0,85</b>
<b>57</b>	<b>THR</b>		<b>77,07</b>	<b>52,33</b>	<b>0,81</b>	<b>0,81</b>
<b>26</b>	<b>VAL</b>		<b>46,03</b>	<b>45,87</b>	<b>0,73</b>	<b>0,73</b>

<b>53</b>	<b>GLN</b>	<b>H</b>	<b>146,87</b>	<b>74,61</b>	<b>-0,59</b>	<b>0,59</b>
<b>30</b>	<b>ASN</b>		<b>53,19</b>	<b>42,51</b>	<b>-0,51</b>	<b>0,51</b>
14	SER		73,33	53,83	0,41	0,41
16	GLU		81,87	23,61	0,36	0,36
69	SER		36,91	32,06	0,36	0,36
31	ASN	H	68,16	17,44	-0,21	0,21
22	THR		53,37	11,88	0,19	0,19
67	SER		17,29	16,83	0,15	0,15
20	SER		77,72	8,53	0,14	0,14
12	PRO		72,19	25,45	0,12	0,12
56	VAL		66,37	16,66	-0,12	0,12
60	ASP		61,84	6,5	-0,11	0,11
73	THR		69,46	16,93	0,1	0,1
17	GLN		47,27	41,79	0,08	0,08
24	SER		37,71	35,01	0,05	0,05
54	GLU		93,02	10,6	-0,05	0,05
58	GLU		154,24	3,58	0,05	0,05
10	ILE		33,1	3,56	-0,04	0,04
55	SER	H	70,17	60,32	0,04	0,04
13	PRO		16,67	1,84	0,03	0,03
68	LEU		7,35	1,92	0,03	0,03
71	THR		45,38	15,86	0,01	0,01

Связь: вид связи, если образуется водородная связь или солевой мостик, H: водородная связь, S: солевой мостик

ASA: доступная площадь поверхности

BSA: площадь скрытой поверхности

ДельтаG: изменение энергии, положительное подразумевает более гидрофобное взаимодействие, тогда как отрицательное указывает на более гидрофильное взаимодействие

Абс дельтаG: абсолютное значение дельтаG, сортировка в таблице выполнена по этому критерию.

Остатки (выделены жирным шрифтом) с изменением дельтаG выше 0,5 можно рассматривать как остатки, которые вносят больший вклад в стабилизацию белка.

#### *Анализ интерфейса для CH1\_Ск 1cz8, 4nyl, 1l7i, hCD47-1\_1F8*

**[00125]** Анализ интерфейса для вышеуказанных четырех структур включает солевой мостик, водородную связь и гидрофобное взаимодействие. Рассчитывали все дельтаG и по дельтаG ранжировали аминокислоты. Для каждой структуры для дальнейшего анализа выбирали первые 10 пар. Фокусом анализа было гидрофобное взаимодействие вне зависимости от других взаимодействий. Затем для ведущих кандидатов выбирали главные 5 пар.

#### **Перекодирование последовательности CH1**

Перекодирование		1cz8	117i	4nyl	1F8
1	<b>ALA</b>	ALA 124	ALA 114	ALA 122	ALA 119
2	<b>SER</b>	SER 125	SER 115	SER 123	SER 120
3	<b>THR</b>	THR 126	THR 116	THR 124	THR 121
4	<b>LYS</b>	LYS 127	LYS 117	LYS 125	LYS 122
5	<b>GLY</b>	GLY 128	GLY 118	GLY 126	GLY 123
6	<b>PRO</b>	PRO 129	PRO 119	PRO 127	PRO 124
7	<b>SER</b>	SER 130	SER 120	SER 128	SER 125
8	<b>VAL</b>	VAL 131	VAL 121	VAL 129	VAL 126
9	<b>PHE</b>	PHE 132	PHE 122	PHE 130	PHE 127
10	<b>PRO</b>	PRO 133	PRO 123	PRO 131	PRO 128
11	<b>LEU</b>	LEU 134	LEU 124	LEU 132	LEU 129
12	<b>ALA</b>	ALA 135	ALA 125	ALA 133	ALA 130
13	<b>PRO</b>	PRO 136	PRO 126	PRO 134	PRO 131
14	<b>SER</b>	SER 137	SER 127	/	SER 132
15	<b>SER</b>	/	SER 128	/	SER 133
16	<b>LYS</b>	/	LYS 129	/	LYS 134
17	<b>SER</b>	/	SER 130	/	SER 135
18	<b>THR</b>	/	THR 131	/	THR 136
19	<b>SER</b>	/	SER 132	/	SER 137
20	<b>GLY</b>	/	GLY 133	/	GLY 138
21	<b>GLY</b>	GLY 144	GLY 134	GLY 142	GLY 139
22	<b>THR</b>	THR 145	THR 135	THR 143	THR 140
23	<b>ALA</b>	ALA 146	ALA 136	ALA 144	ALA 141
24	<b>ALA</b>	ALA 147	ALA 137	ALA 145	ALA 142
25	<b>LEU</b>	LEU 148	LEU 138	LEU 146	LEU 143
26	<b>GLY</b>	GLY 149	GLY 139	GLY 147	GLY 144
27	<b>CYS</b>	CYS 150	CYS 140	CYS 148	CYS 145
28	<b>LEU</b>	LEU 151	LEU 141	LEU 149	LEU 146
29	<b>VAL</b>	VAL 152	VAL 142	VAL 150	VAL 147
30	<b>LYS</b>	LYS 153	LYS 143	LYS 151	LYS 148
31	<b>ASP</b>	ASP 154	ASP 144	ASP 152	ASP 149
32	<b>TYR</b>	TYR 155	TYR 145	TYR 153	TYR 150
33	<b>PHE</b>	PHE 156	PHE 146	PHE 154	PHE 151
34	<b>PRO</b>	PRO 157	PRO 147	PRO 155	PRO 152
35	<b>GLU</b>	GLU 158	GLU 148	GLU 156	GLU 153
36	<b>PRO</b>	PRO 159	PRO 149	PRO 157	PRO 154
37	<b>VAL</b>	VAL 160	VAL 150	VAL 158	VAL 155
38	<b>THR</b>	THR 161	THR 151	THR 159	THR 156
39	<b>VAL</b>	VAL 162	VAL 152	VAL 160	VAL 157
40	<b>SER</b>	SER 163	SER 153	SER 161	SER 158
41	<b>TRP</b>	TRP 164	TRP 154	TRP 162	TRP 159
42	<b>ASN</b>	ASN 165	ASN 155	ASN 163	ASN 160
43	<b>SER</b>	SER 166	SER 156	SER 164	SER 161
44	<b>GLY</b>	GLY 167	GLY 157	GLY 165	GLY 162
45	<b>ALA</b>	ALA 168	ALA 158	ALA 166	ALA 163
46	<b>LEU</b>	LEU 169	LEU 159	LEU 167	LEU 164
47	<b>THR</b>	THR 170	THR 160	THR 168	THR 165
48	<b>SER</b>	SER 171	SER 161	SER 169	SER 166
49	<b>GLY</b>	GLY 172	GLY 162	GLY 170	GLY 167

50	<b>VAL</b>	VAL 173	VAL 163	VAL 171	VAL 168
51	<b>HIS</b>	HIS 174	HIS 164	HIS 172	HIS 169
52	<b>THR</b>	THR 175	THR 165	THR 173	THR 170
53	<b>PHE</b>	PHE 176	PHE 166	PHE 174	PHE 171
54	<b>PRO</b>	PRO 177	PRO 167	PRO 175	PRO 172
55	<b>ALA</b>	ALA 178	ALA 168	ALA 176	ALA 173
56	<b>VAL</b>	VAL 179	VAL 169	VAL 177	VAL 174
57	<b>LEU</b>	LEU 180	LEU 170	LEU 178	LEU 175
58	<b>GLN</b>	GLN 181	GLN 171	GLN 179	GLN 176
59	<b>SER</b>	SER 182	SER 172	SER 180	SER 177
60	<b>SER</b>	SER 183	SER 173	SER 181	SER 178
61	<b>GLY</b>	GLY 184	GLY 174	GLY 182	GLY 179
62	<b>LEU</b>	LEU 185	LEU 175	LEU 183	LEU 180
63	<b>TYR</b>	TYR 186	TYR 176	TYR 184	TYR 181
64	<b>SER</b>	SER 187	SER 177	SER 185	SER 182
65	<b>LEU</b>	LEU 188	LEU 178	LEU 186	LEU 183
66	<b>SER</b>	SER 189	SER 179	SER 187	SER 184
67	<b>SER</b>	SER 190	SER 180	SER 188	SER 185
68	<b>VAL</b>	VAL 191	VAL 181	VAL 189	VAL 186
69	<b>VAL</b>	VAL 192	VAL 182	VAL 190	VAL 187
70	<b>THR</b>	THR 193	THR 183	THR 191	THR 188
71	<b>VAL</b>	VAL 194	VAL 184	VAL 192	VAL 189
72	<b>PRO</b>	PRO 195	PRO 185	PRO 193	PRO 190
73	<b>SER</b>	SER 196	SER 186	SER 194	SER 191
74	<b>SER</b>	SER 197	SER 187	SER 195	SER 192
75	<b>SER</b>	SER 198	SER 188	SER 196	SER 193
76	<b>LEU</b>	LEU 199	LEU 189	LEU 197	LEU 194
77	<b>GLY</b>	GLY 200	GLY 190	GLY 198	GLY 195
78	<b>THR</b>	THR 201	THR 191	THR 199	THR 196
79	<b>GLN</b>	GLN 202	GLN 192	GLN 200	GLN 197
80	<b>THR</b>	THR 203	THR 193	THR 201	THR 198
81	<b>TYR</b>	TYR 204	TYR 194	TYR 202	TYR 199
82	<b>ILE</b>	ILE 205	ILE 195	ILE 203	ILE 200
83	<b>CYS</b>	CYS 206	CYS 196	CYS 204	CYS 201
84	<b>ASN</b>	ASN 207	ASN 197	ASN 205	ASN 202
85	<b>VAL</b>	VAL 208	VAL 198	VAL 206	VAL 203
86	<b>ASN</b>	ASN 209	ASN 199	ASN 207	ASN 204
87	<b>HIS</b>	HIS 210	HIS 200	HIS 208	HIS 205
88	<b>LYS</b>	LYS 211	LYS 201	LYS 209	LYS 206
89	<b>PRO</b>	PRO 212	PRO 202	PRO 210	PRO 207
90	<b>SER</b>	SER 213	SER 203	SER 211	SER 208
91	<b>ASN</b>	ASN 214	ASN 204	ASN 212	ASN 209
92	<b>THR</b>	THR 215	THR 205	THR 213	THR 210
93	<b>LYS</b>	LYS 216	LYS 206	LYS 214	LYS 211
94	<b>VAL</b>	VAL 217	VAL 207	VAL 215	VAL 212
95	<b>ASP</b>	ASP 218	ASP 208	ASP 216	ASP 213
96	<b>LYS</b>	LYS 219	LYS 209	LYS 217	LYS 214
97	<b>LYS</b>	LYS 220	LYS 210	LYS 218	LYS 215
98	<b>VAL</b>	VAL 221	VAL 211	VAL 219	VAL 216
99	<b>GLU</b>	GLU 222	GLU 212	GLU 220	GLU 217



100	<b>PRO</b>	PRO 223	PRO 213		PRO 218
101	<b>LYS</b>	LYS 224	LYS 214		LYS 219
102	<b>SER</b>		SER 215		SER 220
103	<b>CYS</b>		CYS 216		

### Перекодирование последовательности Ск

Перекодирование		1cz8	117i	4nyl	1F8
1	<b>ARG</b>	ARG 108	ARG 108	ARG 108	ARG 114
2	<b>THR</b>	THR 109	THR 109	THR 109	THR 115
3	<b>VAL</b>	VAL 110	VAL 110	VAL 110	VAL 116
4	<b>ALA</b>	ALA 111	ALA 111	ALA 111	ALA 117
5	<b>ALA</b>	ALA 112	ALA 112	ALA 112	ALA 118
6	<b>PRO</b>	PRO 113	PRO 113	PRO 113	PRO 119
7	<b>SER</b>	SER 114	SER 114	SER 114	SER 120
8	<b>VAL</b>	VAL 115	VAL 115	VAL 115	VAL 121
9	<b>PHE</b>	PHE 116	PHE 116	PHE 116	PHE 122
10	<b>ILE</b>	ILE 117	ILE 117	ILE 117	ILE 123
11	<b>PHE</b>	PHE 118	PHE 118	PHE 118	PHE 124
12	<b>PRO</b>	PRO 119	PRO 119	PRO 119	PRO 125
13	<b>PRO</b>	PRO 120	PRO 120	PRO 120	PRO 126
14	<b>SER</b>	SER 121	SER 121	SER 121	SER 127
15	<b>ASP</b>	ASP 122	ASP 122	ASP 122	ASP 128
16	<b>GLU</b>	GLU 123	GLU 123	GLU 123	GLU 129
17	<b>GLN</b>	GLN 124	GLN 124	GLN 124	GLN 130
18	<b>LEU</b>	LEU 125	LEU 125	LEU 125	LEU 131
19	<b>LYS</b>	LYS 126	LYS 126	LYS 126	LYS 132
20	<b>SER</b>	SER 127	SER 127	SER 127	SER 133
21	<b>GLY</b>	GLY 128	GLY 128	GLY 128	GLY 134
22	<b>THR</b>	THR 129	THR 129	THR 129	THR 135
23	<b>ALA</b>	ALA 130	ALA 130	ALA 130	ALA 136
24	<b>SER</b>	SER 131	SER 131	SER 131	SER 137
25	<b>VAL</b>	VAL 132	VAL 132	VAL 132	VAL 138
26	<b>VAL</b>	VAL 133	VAL 133	VAL 133	VAL 139
27	<b>CYS</b>	CYS 134	CYS 134	CYS 134	CYS 140
28	<b>LEU</b>	LEU 135	LEU 135	LEU 135	LEU 141
29	<b>LEU</b>	LEU 136	LEU 136	LEU 136	LEU 142
30	<b>ASN</b>	ASN 137	ASN 137	ASN 137	ASN 143
31	<b>ASN</b>	ASN 138	ASN 138	ASN 138	ASN 144
32	<b>PHE</b>	PHE 139	PHE 139	PHE 139	PHE 145
33	<b>TYR</b>	TYR 140	TYR 140	TYR 140	TYR 146
34	<b>PRO</b>	PRO 141	PRO 141	PRO 141	PRO 147
35	<b>ARG</b>	ARG 142	ARG 142	ARG 142	ARG 148
36	<b>GLU</b>	GLU 143	GLU 143	GLU 143	GLU 149
37	<b>ALA</b>	ALA 144	ALA 144	ALA 144	ALA 150
38	<b>LYS</b>	LYS 145	LYS 145	LYS 145	LYS 151
39	<b>VAL</b>	VAL 146	VAL 146	VAL 146	VAL 152

40	<b>GLN</b>	GLN 147	GLN 147	GLN 147	GLN 153
41	<b>TRP</b>	TRP 148	TRP 148	TRP 148	TRP 154
42	<b>LYS</b>	LYS 149	LYS 149	LYS 149	LYS 155
43	<b>VAL</b>	VAL 150	VAL 150	VAL 150	VAL 156
44	<b>ASP</b>	ASP 151	ASP 151	ASP 151	ASP 157
45	<b>ASN</b>	ASN 152	ASN 152	ASN 152	ASN 158
46	<b>ALA</b>	ALA 153	ALA 153	ALA 153	ALA 159
47	<b>LEU</b>	LEU 154	LEU 154	LEU 154	LEU 160
48	<b>GLN</b>	GLN 155	GLN 155	GLN 155	GLN 161
49	<b>SER</b>	SER 156	SER 156	SER 156	SER 162
50	<b>GLY</b>	GLY 157	GLY 157	GLY 157	GLY 163
51	<b>ASN</b>	ASN 158	ASN 158	ASN 158	ASN 164
52	<b>SER</b>	SER 159	SER 159	SER 159	SER 165
53	<b>GLN</b>	GLN 160	GLN 160	GLN 160	GLN 166
54	<b>GLU</b>	GLU 161	GLU 161	GLU 161	GLU 167
55	<b>SER</b>	SER 162	SER 162	SER 162	SER 168
56	<b>VAL</b>	VAL 163	VAL 163	VAL 163	VAL 169
57	<b>THR</b>	THR 164	THR 164	THR 164	THR 170
58	<b>GLU</b>	GLU 165	GLU 165	GLU 165	GLU 171
59	<b>GLN</b>	GLN 166	GLN 166	GLN 166	GLN 172
60	<b>ASP</b>	ASP 167	ASP 167	ASP 167	ASP 173
61	<b>SER</b>	SER 168	SER 168	SER 168	SER 174
62	<b>LYS</b>	LYS 169	LYS 169	LYS 169	LYS 175
63	<b>ASP</b>	ASP 170	ASP 170	ASP 170	ASP 176
64	<b>SER</b>	SER 171	SER 171	SER 171	SER 177
65	<b>THR</b>	THR 172	THR 172	THR 172	THR 178
66	<b>TYR</b>	TYR 173	TYR 173	TYR 173	TYR 179
67	<b>SER</b>	SER 174	SER 174	SER 174	SER 180
68	<b>LEU</b>	LEU 175	LEU 175	LEU 175	LEU 181
69	<b>SER</b>	SER 176	SER 176	SER 176	SER 182
70	<b>SER</b>	SER 177	SER 177	SER 177	SER 183
71	<b>THR</b>	THR 178	THR 178	THR 178	THR 184
72	<b>LEU</b>	LEU 179	LEU 179	LEU 179	LEU 185
73	<b>THR</b>	THR 180	THR 180	THR 180	THR 186
74	<b>LEU</b>	LEU 181	LEU 181	LEU 181	LEU 187
75	<b>SER</b>	SER 182	SER 182	SER 182	SER 188
76	<b>LYS</b>	LYS 183	LYS 183	LYS 183	LYS 189
77	<b>ALA</b>	ALA 184	ALA 184	ALA 184	ALA 190
78	<b>ASP</b>	ASP 185	ASP 185	ASP 185	ASP 191
79	<b>TYR</b>	TYR 186	TYR 186	TYR 186	TYR 192
80	<b>GLU</b>	GLU 187	GLU 187	GLU 187	GLU 193
81	<b>LYS</b>	LYS 188	LYS 188	LYS 188	LYS 194
82	<b>HIS</b>	HIS 189	HIS 189	HIS 189	HIS 195
83	<b>LYS</b>	LYS 190	LYS 190	LYS 190	LYS 196
84	<b>VAL</b>	VAL 191	VAL 191	VAL 191	VAL 197
85	<b>TYR</b>	TYR 192	TYR 192	TYR 192	TYR 198

86	<b>ALA</b>	ALA 193	ALA 193	ALA 193	ALA 199
87	<b>CYS</b>	CYS 194	CYS 194	CYS 194	CYS 200
88	<b>GLU</b>	GLU 195	GLU 195	GLU 195	GLU 201
89	<b>VAL</b>	VAL 196	VAL 196	VAL 196	VAL 202
90	<b>THR</b>	THR 197	THR 197	THR 197	THR 203
91	<b>HIS</b>	HIS 198	HIS 198	HIS 198	HIS 204
92	<b>GLN</b>	GLN 199	GLN 199	GLN 199	GLN 205
93	<b>GLY</b>	GLY 200	GLY 200	GLY 200	GLY 206
94	<b>LEU</b>	LEU 201	LEU 201	LEU 201	LEU 207
95	<b>SER</b>	SER 202	SER 202	SER 202	SER 208
96	<b>SER</b>	SER 203	SER 203	SER 203	SER 209
97	<b>PRO</b>	PRO 204	PRO 204	PRO 204	PRO 210
98	<b>VAL</b>	VAL 205	VAL 205	VAL 205	VAL 211
99	<b>THR</b>	THR 206	THR 206	THR 206	THR 212
100	<b>LYS</b>	LYS 207	LYS 207	LYS 207	LYS 213
101	<b>SER</b>	SER 208	SER 208	SER 208	SER 214
102	<b>PHE</b>	PHE 209	PHE 209	PHE 209	PHE 215
103	<b>ASN</b>	ASN 210	ASN 210	ASN 210	ASN 216
104	<b>ARG</b>	ARG 211	ARG 211	ARG 211	ARG 217
105	<b>GLY</b>	GLY 212	GLY 212		GLY 218
106	<b>GLU</b>	GLU 213	GLU 213		GLU 219
107	<b>CYS</b>		CYS 214		

Сводная таблица главных остатков со свободной энергией для 1cz8, 4nyl, 117i и 1F8

1cz8		4nyl		117i		1F8		
53	PHE	53	PHE	103	<b>CYS</b>	53	PHE	<b>CH1</b>
9	PHE	9	PHE	53	PHE	9	PHE	
11	LEU	11	LEU	9	PHE	11	LEU	
56	VAL	56	VAL	<b>101</b>	<b>LYS</b>	56	VAL	
28	LEU	28	LEU	56	VAL	<b>30</b>	<b>LYS</b>	
51	HIS	54	PRO	11	LEU	<u>96</u>	<u>LYS</u>	
54	PRO	68	VAL	54	PRO	28	LEU	
68	VAL	24	ALA	28	LEU	24	ALA	
24	ALA	51	HIS	<b>17</b>	<b>SER</b>	68	VAL	
				68	VAL	54	PRO	
				24	ALA			
				<u>96</u>	<u>LYS</u>			
11	PHE	11	PHE	11	PHE	11	PHE	<b>Ск</b>
9	PHE	9	PHE	9	PHE	9	PHE	
28	LEU	28	LEU	<u>100</u>	<u>LYS</u>	<u>100</u>	<u>LYS</u>	
26	VAL	57	THR	57	THR	57	THR	

53	GLN	26	VAL	107	CYS	28	LEU
14	SER	53	GLN	28	LEU	26	VAL
30	ASN	30	ASN	26	VAL	53	GLN
				53	GLN		
				12	PRO		

Выделены жирным шрифтом: уникальные остатки

Подчеркнуты: низкогомологичные остатки

Без отметки: консервативные остатки

### Остатки, обладающие наибольшим стабилизирующим действием

1cz8		4nyl		117i		1F8	
СН							
9	PHE	9	PHE			9	PHE
51	PHE	11	LEU				
53	PHE	53	PHE			53	PHE
		54	PRO	103	CYS		
СК							
11	PHE	9	PHE	9	PHE	9	PHE
		11	PHE	11	PHE	11	PHE

Пять остатков на интерфейсе, имеющих важное значение для взаимодействия СК и СН1 (исходя из структуры и свободной энергии)

СН1		СК	
Положение	Остаток	Положение	Остаток
9	PHE	17	GLN
11	LEU	11, 26	PHE, VAL
24	ALA	9, 11	PHE
51	HIS	31	ASN
53	PHE	69	SER

Примечание: исключены остатки, образующие солевые мостики

### Пример 2: Обнаружение остатков на интерфейсе, имеющих важное значение для взаимодействия СК и СН1

[00126] На основе анализа интерфейса для СК и СН1 в этом примере суммированы остатки на интерфейсе, имеющие наибольшее значение для взаимодействия СК и СН1 (см. **фиг.2** и таблицу 4 ниже).

Таблица 4. Пары остатков, влияющие на взаимодействие СК/СН1

СН1		СК		№ пары
Положение	Остаток	Положение	Остаток	
9	PHE	17	GLN	1
11	LEU	11, 26	PHE, VAL	2
24	ALA	9, 11	PHE	3

51	HIS	31	ASN	4
53	PHE	69	SER	5

**Примечание:** исключены остатки, образующие солевые мостики

**[00127]** Из таблицы выше одиночные мутации на аланин или триптофан использовали для тестирования каждого остатка на интерфейсе. Конструировали IgG(-Fv) без VH и VL и экспрессировали для скрининга Ala и Trp. Перечень мутаций приведен ниже.

### Скрининг аланина

Название	Описание	Ск	СН1
Ск/CH1_001	Ск/CH1	Дикий тип	Дикий тип
Ск/CH1_002	Ск_L28Y_S69W/CH1_H51A_F53G	L28Y_S69W	H51A_F53G
Ск/CH1_003	Ск/CH1_H51A_F53G	Дикий тип	H51A_F53G
Ск/CH1_004	Ск/CH1_D31K_F53T_V68F	Дикий тип	D31K_F53T_V68F
Ск/CH1_005	Ск/CH1_F9A_F53A	Дикий тип	F9A_F53A
Ск/CH1_006	Ск_F9G_F11A_K100A/CH1	F9G_F11A_K100A	Дикий тип
Ск/CH1_007	Ск_F11A/CH1	F11A	Дикий тип
Ск/CH1_008	Ск_F9A_F11A/CH1	F9A_F11A	Дикий тип
Ск/CH1_009	Ск_F11A_K100A/CH1	F11A_K100A	Дикий тип
Ск/CH1_010	Ск_F9A_K100A/CH1	F9A_K100A	Дикий тип
Ск/CH1_011	Ск/CH1_F9A_L11A	Дикий тип	F9A_L11A
Ск/CH1_012	Ск/CH1_L11A_F53A	Дикий тип	L11A_F53A
Ск/CH1_013	Ск/CH1_F9A	Дикий тип	F9A
Ск/CH1_014	Ск/CH1_L11A	Дикий тип	L11A
Ск/CH1_015	Ск_F9A/CH1	F9A	Дикий тип
Ск/CH1_016	Ск_F9A_F11M/CH1	F9A_F11M	Дикий тип
Ск/CH1_017	Ск/CH1_A24F	Дикий тип	A24F
Ск/CH1_018	Ск/CH1_A24L	Дикий тип	A24L
Ск/CH1_019	Ск_F9A_F11A/CH1_A24F	F9A_F11A	A24F
Ск/CH1_020	Ск_F9A_F11A/CH1_A24L	F9A_F11A	A24L
Ск/CH1_021	Ск_F9A_F11M/CH1_A24F	F9A_F11M	A24F
Ск/CH1_022	Ск_F9A_F11M/CH1_A24L	F9A_F11M	A24L
Ск/CH1_023	Ск_V26A/CH1	V26A	Дикий тип
Ск/CH1_024	Ск_V26A_F11A/CH1	V26A_F11A	Дикий тип
Ск/CH1_025	Ск/CH1_L11F_L28G	Дикий тип	L11F_L28G
Ск/CH1_026	Ск_V26A/CH1_L11F_L28G	V26A	L11F_L28G
Ск/CH1_027	Ск_V26A_F11A/CH1_L11F_L28G	V26A_F11A	L11F_L28G

### Скрининг триптофана

Название	Описание	Ск	СН1
Ск/СН1_028	Ск/СН1_A24W	Дикий тип	A24W
Ск/СН1_029	Ск/СН1_L11F	Дикий тип	L11F
Ск/СН1_030	Ск/СН1_L11W	Дикий тип	L11W
Ск/СН1_031	Ск_F9A_F11A/СН1_L11F_A24F	F9A_F11A	L11F_A24F
Ск/СН1_032	Ск_V26W/СН1	V26W	Дикий тип

**[00128]** Как показано на изображении SDS-ПААГ на **фиг.3**, для Пары 2 (Ск\_F11\_V26 и СН1\_L11) два мутанта Ск\_F11A/СН1 и Ск\_V26A/СН1 в значительной степени препятствовали взаимодействию Ск и СН1; два мутанта Ск\_V26W/СН1 и Ск/СН1\_L11W также нарушали указанное взаимодействие (фиг.4). Мутации Ск/СН1\_L11A и Ск/СН1\_F9A (из Пары 1) также нарушали взаимодействие. Мутанты Ск\_F9A/СН1, Ск/СН1\_A24F и Ск/СН1\_A24L, напротив, не влияли на взаимодействие Ск и СН1. Это позволяет предположить, что Пара 3 (Ск\_F9 и СН1\_A24) не имеет важного значения для связывания Ск и СН1.

№ пары	СН1	Ск	Важное значение
Пара 1	Phe9	Gln17	Да
Пара 2	Leu11	Phe11, Val26	Да
Пара 3	Ala24	Phe9	Нет

### **Пример 3: Разработка пар мутаций для Пары 1 посредством Discovery Studio**

**[00129]** После идентификации пар остатков, которые имеют важное значение для поддержания взаимодействия между Ск и СН1, в этом примере тестировали пары мутаций, которые определяют новые взаимодействия. Обоснованием этой разработки является то, что: мутантный Ск может демонстрировать хорошее связывание с мутантным СН1; но мутантный Ск не связывается или слабо связывается с СН1 дикого типа, а мутантный СН1 демонстрирует слабое связывание или отсутствие связывания с Ск дикого типа.

#### *Разработка мутаций для Пары 1*

**[00130]** Остатки в Пары 1 представляют собой Ск\_Q17 и СН1\_F9 (таблица 4). Авторы настоящего изобретения создавали эти мутации Ск/СН1\_033 по 050 и анализировали их. Пары мутаций Ск/СН1\_051-066 разрабатывали посредством программного обеспечения, Discovery Studio (DS), с созданием случайных мутаций для этого сайта. Получали восемь пар для Ск\_Q17 и СН1\_F9, перечисленных ниже.

Мутация	Энергия мутации	Эффект	ВДВ	Электростатические	Энтропия	Неполярные
H:PHE9>ILE.L:GLN17>HIS	0,03	Нейтральный	0,15	0,03	-0,07	0
H:PHE9>HIS.L:GLN17>ARG	0,07	Нейтральный	-1,42	1,4	0,09	0
H:PHE9>LYS.L:GLN17>ASP	0,09	Нейтральный	2,15	-3,23	0,72	0
H:PHE9>HIS.L:GLN17>HIS	0,19	Нейтральный	0,16	-0,07	0,17	0
H:PHE9>PRO.L:GLN17>ARG	0,25	Нейтральный	0,13	1,33	-0,55	0
H:PHE9>MET.L:GLN17>HIS	0,29	Нейтральный	0,12	0,09	0,21	0
H:PHE9>GLN.L:GLN17>ARG	0,3	Нейтральный	-0,42	1,89	-0,49	0
H:PHE9>GLN.L:GLN17>HIS	0,33	Нейтральный	-0,46	-0,12	0,7	0

**Примечания:** энергия мутации: отличие энергии после мутации; низкое значение означает более стабильную;

ВДВ: ван-дер-ваальсовы

Ск/CH1_033	Ск_Q17R/CH1	Q17R	Дикий тип
Ск/CH1_034	Ск_Q17K/CH1	Q17K	Дикий тип
Ск/CH1_035	Ск_Q17D/CH1	Q17D	Дикий тип
Ск/CH1_036	Ск_Q17E/CH1	Q17E	Дикий тип
Ск/CH1_037	Ск/CH1_F9R	Дикий тип	F9R
Ск/CH1_038	Ск/CH1_F9K	Дикий тип	F9K
Ск/CH1_039	Ск/CH1_F9D	Дикий тип	F9D
Ск/CH1_040	Ск/CH1_F9E	Дикий тип	F9E
Ск/CH1_041	Ск_F11E_V26A/CH1_L11R	F11E_V26A	L11R
Ск/CH1_042	Ск_Q17K_F11K_V26A/CH1_F9E_L11E	Q17K_F11K_V26A	F9E_L11E
Ск/CH1_043	Ск_Q17R/CH1_F9D	Ск_Q17R	CH1_F9D
Ск/CH1_044	Ск_Q17K/CH1_F9D	Ск_Q17K	CH1_F9D
Ск/CH1_045	Ск_Q17R/CH1_F9E	Ск_Q17R	CH1_F9E
Ск/CH1_046	Ск_Q17K/CH1_F9E	Ск_Q17K	CH1_F9E
Ск/CH1_047	Ск_Q17D/CH1_F9R	Ск_Q17D	CH1_F9R
Ск/CH1_048	Ск_Q17D/CH1_F9K	Ск_Q17D	CH1_F9K
Ск/CH1_049	Ск/CH1_F9D_L11A	Ск	CH1_F9D_L11A
Ск/CH1_050	Ск_Q17K/CH1_F9D_L11A	Ск_Q17K	CH1_F9D_L11A
Ск/CH1_051	Ск_Q17H/CH1_F9I	Ск_Q17H	CH1_F9I
Ск/CH1_052	Ск_Q17R/CH1_F9H	Ск_Q17R	CH1_F9H
Ск/CH1_053	Ск_Q17H/CH1_F9H	Ск_Q17H	CH1_F9H
Ск/CH1_054	Ск_Q17R/CH1_F9P	Ск_Q17R	CH1_F9P
Ск/CH1_055	Ск_Q17D/CH1_F9H	Ск_Q17D	CH1_F9H
Ск/CH1_056	Ск_Q17I/CH1_F9H	Ск_Q17I	CH1_F9H
Ск/CH1_057	Ск_Q17H/CH1_F9M	Ск_Q17H	CH1_F9M
Ск/CH1_058	Ск_Q17R/CH1_F9Q	Ск_Q17R	CH1_F9Q
Ск/CH1_059	Ск_Q17H/CH1_F9Q	Ск_Q17H	CH1_F9Q
Ск/CH1_060	Ск_Q17H/CH1	Ск_Q17H	CH1
Ск/CH1_061	Ск_Q17I/CH1	Ск_Q17I	CH1
Ск/CH1_062	Ск/CH1_F9I	Ск	CH1_F9I
Ск/CH1_063	Ск/CH1_F9H	Ск	CH1_F9H
Ск/CH1_064	Ск/CH1_F9P	Ск	CH1_F9P
Ск/CH1_065	Ск/CH1_F9M	Ск	CH1_F9M
Ск/CH1_066	Ск/CH1_F9Q	Ск	CH1_F9Q

[00131] Две подходящие пары мутаций приведены ниже:

ID мутации	Нумерация положений	Нумерация согласно Кабату
Ск/CH1_043	Ск_Q17R/CH1_F9D	Ск_Q124R/CH1_F122D
Ск/CH1_044	Ск_Q17K/CH1_F9D	Ск_Q124K/CH1_F122D

#### Пример 4: Разработка пар мутаций для Пары 2 посредством Discovery Studio

**[00132]** Для Пары 2 для каждого остатка на интерфейсе тестировали одиночные мутации - аланин/триптофан. Конструировали IgG(-Fv) без VH и VL и экспрессировали для скрининга Ala и Trp. В этом примере использовали Discovery Studio для создания случайных мутаций для этого сайта.

**[00133]** Три подходящих пары мутаций представляют собой Cк/CH1\_072, Cк/CH1\_079 и Cк/CH1\_107, перечисленные ниже:

ID мутации	Нумерация положений	Нумерация согласно Кабату
Cк/CH1_072	Cк V26W/CH1 L11K L28N	Cк V133W/CH1 L124K L141N
Cк/CH1_079	Cк F11W V26G/CH1 L11W	Cк F118W V133G/CH1 L124W
Cк/CH1_107	Cк V26W/CH1 L11W	Cк V133W/CH1 L124W

#### Разработка мутаций для Пары 2

**[00134]** Для Пары 2 важное значение имеют остатки Cк\_F11\_V26 и CH1\_L11\_L28 (см. таблицу 4). Стратегия разработки мутаций для этой «горячей точки» заключается в фиксировании мутации V26W или L11W. В этом примере также тестировали введение насыщенных точечных мутаций для Cк\_F11\_V26 и CH1\_L11\_L28; затем применение DS для вычисления всех эффективных мутаций.

**[00135]** **Стратегия I:** с фиксированной мутацией V26W вводили произвольные точечные мутации в CH1\_L11\_L28; затем использовали программное обеспечение DS с получением нескольких пар мутаций для этого сайта. Некоторые предпочтительные пары мутаций перечислены ниже:

Мутация	Энергия мутации	Эффект	ВДВ	Электростатические	Энтропия	Неполярные
H:LEU11>VAL.L:VAL26>TRP	-0,14	Нейтральный	-0,31	0,11	-0,04	0
H:LEU11>ASN.L:VAL26>TRP	-0,08	Нейтральный	-0,56	0,29	0,06	0
H:LEU11>MET.L:VAL26>TRP	-0,03	Нейтральный	-0,46	0,32	0,04	0
H:LEU11>ILE.L:VAL26>TRP	0,18	Нейтральный	-0,01	0,3	0,04	0
H:LEU11>SER.L:VAL26>TRP	0,31	Нейтральный	-0,83	0,58	0,49	0
H:LEU11>GLU.L:VAL26>TRP	0,38	Нейтральный	-1,76	2,45	0,04	0
H:LEU11>GLY.L:VAL26>TRP	0,41	Нейтральный	0,16	0,18	0,27	0

Мутация	Энергия мутации	Эффект	ВДВ	Электро-статические	Энтропия	Неполярные
H:LEU28>SER.L:VAL26>TRP	-0,54	Стабилизирующий	-2,58	0,34	0,66	0
H:LEU28>GLU.L:VAL26>TRP	-0,5	Нейтральный	-4,5	3,13	0,21	0
H:LEU28>ASN.L:VAL26>TRP	-0,43	Нейтральный	-2,26	0,37	0,58	0
H:LEU28>CYS.L:VAL26>TRP	-0,21	Нейтральный	-1,49	0,12	0,54	0



H:LEU28>THR.L:VAL26>TRP	-0,09	Нейтральный	-1,22	0,3	0,42	0
H:LEU28>VAL.L:VAL26>TRP	-0,06	Нейтральный	-1,14	0,16	0,49	0
H:LEU28>ALA.L:VAL26>TRP	0,1	Нейтральный	-1,04	0,12	0,64	0
H:LEU28>ASP.L:VAL26>TRP	0,38	Нейтральный	-2,6	2,36	0,57	0

Мутация	Энергия мутации	Эффект	ВДВ	Электро-статические	Энтропия	Неполярные
H:LEU11>ILE.H:LEU28>PHE.L:VAL26>TRP	-2,85	Стабилизирующий	-6,21	0,1	0,23	0
H:LEU11>ARG.H:LEU28>PRO.L:VAL26>TRP	-2,38	Стабилизирующий	-7,66	0,45	1,39	0
H:LEU11>ILE.H:LEU28>GLN.L:VAL26>TRP	-1,86	Стабилизирующий	-4,73	0,48	0,3	0
H:LEU11>ARG.H:LEU28>GLY.L:VAL26>TRP	-1,64	Стабилизирующий	-6,13	0,44	1,37	0
H:LEU11>ARG.H:LEU28>ASP.L:VAL26>TRP	-1,46	Стабилизирующий	-7,85	2,67	1,29	0
H:LEU11>LYS.H:LEU28>ASN.L:VAL26>TRP	-1,33	Стабилизирующий	-5,94	1,42	1,06	0
H:LEU11>THR.H:LEU28>HIS.L:VAL26>TRP	-1,32	Стабилизирующий	-4,18	0,55	0,56	0
H:LEU11>LEU.H:LEU28>THR.L:VAL26>TRP	-1,17	Стабилизирующий	-3,35	0,42	0,33	0
H:LEU11>ALA.H:LEU28>ARG.L:VAL26>TRP	-1,16	Стабилизирующий	-4,55	-0,57	1,59	0
H:LEU11>GLU.H:LEU28>GLN.L:VAL26>TRP	-1,12	Стабилизирующий	-5,43	2,65	0,31	0

**[00136] Стратегия 2:** с фиксированной мутацией L11W вводили произвольные точечные мутации в Cк\_F11\_V26; затем использовали программное обеспечение DS с получением нескольких пар мутаций для этого сайта. Некоторые предпочтительные пары мутаций перечислены ниже:

Мутация	Энергия мутации	Эффект	ВДВ	Электро-статические	Энтропия	Неполярные
H:LEU11>TRP.L:VAL26>LEU	-2,24	Стабилизирующий	-4,78	0,32	-0,01	0
H:LEU11>TRP.L:VAL26>MET	-1,89	Стабилизирующий	-4,2	0,19	0,13	0
H:LEU11>TRP.L:VAL26>TRP	-1,38	Стабилизирующий	-3,01	0,58	-0,19	0
H:LEU11>TRP.L:VAL26>GLU	-1,21	Стабилизирующий	-3,88	0,87	0,34	0
H:LEU11>TRP.L:VAL26>LYS	-0,9	Стабилизирующий	-5,72	3,44	0,27	0
H:LEU11>TRP.L:VAL26>CYS	-0,84	Стабилизирующий	-1,95	0,12	0,09	0
H:LEU11>TRP.L:VAL26>SER	-0,68	Стабилизирующий	-2,65	0,42	0,49	0
H:LEU11>TRP.L:VAL26>ALA	-0,6	Стабилизирующий	-1,65	0,02	0,25	0
H:LEU11>TRP.L:VAL26>GLY	-0,26	Нейтральный	-1,66	0,16	0,56	0
H:LEU11>TRP.L:VAL26>PRO	-0,19	Нейтральный	-0,91	0,1	0,25	0

Мутация	Энергия мутации	Эффект	ВДВ	Электро-статические	Энтропия	Неполярные
H:LEU11>TRP.L:PHE11>HIS	-0,3	Нейтральный	-1,46	0,14	0,41	0

Мутация	Энергия мутации	Эффект	ВДВ	Электростатические	Энтропия	Неполярные
H:LEU11>TRP.L:PHE11>TRP.L:VAL26>LYS	-1,94	Стабилизирующий	-7,43	3,17	0,22	0
H:LEU11>TRP.L:PHE11>HIS.L:VAL26>ARG	-1,68	Стабилизирующий	-7,35	2,56	0,81	0
H:LEU11>TRP.L:PHE11>TRP.L:VAL26>GLY	-1,64	Стабилизирующий	-4,45	0,07	0,63	0
H:LEU11>TRP.L:PHE11>HIS.L:VAL26>LEU	-1,58	Стабилизирующий	-4	0,3	0,31	0
H:LEU11>TRP.L:PHE11>ARG.L:VAL26>TYR	-1,56	Стабилизирующий	-6,43	2,37	0,54	0
H:LEU11>TRP.L:PHE11>ARG.L:VAL26>GLU	-1,34	Стабилизирующий	-6,03	1,87	0,84	0
H:LEU11>TRP.L:PHE11>HIS.L:VAL26>MET	-1,25	Стабилизирующий	-3,3	0,07	0,42	0
H:LEU11>TRP.L:PHE11>HIS.L:VAL26>TRP	-1,21	Стабилизирующий	-3,06	0,33	0,18	0
H:LEU11>TRP.L:PHE11>LEU.L:VAL26>ARG	-1,16	Стабилизирующий	-5,72	2,42	0,56	0
H:LEU11>TRP.L:PHE11>ARG.L:VAL26>LEU	-1,09	Стабилизирующий	-5,83	2,2	0,82	0

**[00137] Стратегия 3:** вводили насыщенные точечные мутации для Ск\_F11\_V26 и СН1\_L11\_L28; затем использовали DS для вычисления всех эффективных мутаций. Получали 23 предпочтительные пары мутаций, перечисленные ниже.

Мутация	Энергия мутации	Эффект	ВДВ	Электростатические	Энтропия	Неполярные
H:LEU11>VAL.L:VAL26>TRP	-0,14	Нейтральный	-	0,31 0,11	-0,04	0
H:LEU11>ASN.L:VAL26>TRP	-0,08	Нейтральный	-	0,56 0,29	0,06	0
H:LEU11>MET.L:VAL26>TRP	-0,03	Нейтральный	-	0,46 0,32	0,04	0
H:LEU11>MET.L:VAL26>GLU	0,14	Нейтральный	-	0,04 -0,17	0,28	0
H:LEU11>ASN.L:VAL26>GLU	0,16	Нейтральный	-	0,65 0,14	0,47	0
H:LEU11>ILE.L:VAL26>TRP	0,18	Нейтральный	-	0,01 0,3	0,04	0
H:LEU11>PRO.L:VAL26>GLU	0,28	Нейтральный	-	0,39 -0,52	0,39	0
H:LEU11>MET.L:VAL26>LEU	0,3	Нейтральный	-	0,78 0,05	-0,13	0
H:LEU11>SER.L:VAL26>TRP	0,31	Нейтральный	-	0,83 0,58	0,49	0
H:LEU11>VAL.L:VAL26>GLU	0,34	Нейтральный	-	0,22 -0,32	0,44	0
H:LEU11>GLU.L:VAL26>TRP	0,38	Нейтральный	-	1,76 2,45	0,04	0
H:LEU11>GLY.L:VAL26>TRP	0,41	Нейтральный	-	0,16 0,18	0,27	0
H:LEU11>ILE.L:VAL26>GLU	0,43	Нейтральный	-	0,38 -0,22	0,4	0
H:LEU11>MET.L:VAL26>MET	0,44	Нейтральный	-	0,91 0,01	-0,02	0
H:LEU28>SER.L:VAL26>TRP	-0,54	Стабилизирующий	-	2,58 0,34	0,66	0
H:LEU28>GLU.L:VAL26>TRP	-0,5	Нейтральный	-	-4,5 3,13	0,21	0
H:LEU28>ASN.L:VAL26>TRP	-0,43	Нейтральный	-	2,26 0,37	0,58	0
H:LEU28>CYS.L:VAL26>TRP	-0,21	Нейтральный	-	1,49 0,12	0,54	0

H:LEU28>THR.L:VAL26>TRP	-0,09	Нейтральный	-	1,22	0,3	0,42	0
H:LEU28>VAL.L:VAL26>TRP	-0,06	Нейтральный	-	1,14	0,16	0,49	0
H:LEU28>ALA.L:VAL26>TRP	0,1	Нейтральный	-	1,04	0,12	0,64	0
H:LEU28>ASP.L:VAL26>TRP	0,38	Нейтральный	-	2,6	2,36	0,57	0
H:LEU28>VAL.L:VAL26>GLU	0,42	Нейтральный	-	0,19	-0,07	0,62	0

**[00138]** На основе вышеуказанных пар мутаций для Пары 1 анализировали все пары мутаций путем SDS-ПААГ (в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, **фиг.4А-Д**); для пары 2 для анализа выбирали некоторые эффективные пары мутаций с самой низкой свободной энергией. Среди всех пар мутаций более эффективны три пары мутаций Ск/СН1\_107. Результаты могут быть сопоставимы с опубликованной парой мутаций. Конструировали IgG(-Fv) без VH и VL, и экспрессировали для каждой пары мутаций. Перечень мутаций приведен ниже.

**[00139]** Три подходящие пары мутаций представляют собой Ск/СН1\_072, Ск/СН1\_079 и Ск/СН1\_107, перечисленные ниже:

Ск/СН1_072	Ск_V26W/СН1_L11K_L28N
Ск/СН1_079	Ск_F11W_V26G/СН1_L11W
Ск/СН1_107	Ск_V26W/СН1_L11W

**[00140]** Как показано на изображениях геля SDS-ПААГ на **фиг.5А-5В**, пара мутаций Ск\_V26W/СН1\_L11W восстанавливала связывание между Ск и СН1 (Ск\_L28Y\_S69W/СН1\_H51A\_F53G использовали в качестве контроля).

Ск/СН1_067	Ск_V26W/СН1_L11I_L28F	Ск_V26W	СН1_L11I_L28F
Ск/СН1_068	Ск_V26W/СН1_L11R_L28P	Ск_V26W	СН1_L11R_L28P
Ск/СН1_069	Ск_V26W/СН1_L11I_L28Q	Ск_V26W	СН1_L11I_L28Q
Ск/СН1_070	Ск_V26W/СН1_L11R_L28G	Ск_V26W	СН1_L11R_L28G
Ск/СН1_071	Ск_V26W/СН1_L11R_L28D	Ск_V26W	СН1_L11R_L28D
Ск/СН1_072	Ск_V26W/СН1_L11K_L28N	Ск_V26W	СН1_L11K_L28N
Ск/СН1_073	Ск_V26W/СН1_L11T_L28H	Ск_V26W	СН1_L11T_L28H
Ск/СН1_074	Ск_V26W/СН1_L28T	Ск_V26W	СН1_L28T
Ск/СН1_075	Ск_V26W/СН1_L11A_L28R	Ск_V26W	СН1_L11A_L28R
Ск/СН1_076	Ск_V26W/СН1_L11E_L28Q	Ск_V26W	СН1_L11E_L28Q
Ск/СН1_077	Ск_F11W_V26K/СН1_L11W	Ск_F11W_V26K	СН1_L11W
Ск/СН1_078	Ск_F11H_V26R/СН1_L11W	Ск_F11H_V26R	СН1_L11W
Ск/СН1_079	Ск_F11W_V26G/СН1_L11W	Ск_F11W_V26G	СН1_L11W
Ск/СН1_080	Ск_F11H_V26L/СН1_L11W	Ск_F11H_V26L	СН1_L11W
Ск/СН1_081	Ск_F11R_V26Y/СН1_L11W	Ск_F11R_V26Y	СН1_L11W
Ск/СН1_082	Ск_F11R_V26E/СН1_L11W	Ск_F11R_V26E	СН1_L11W
Ск/СН1_083	Ск_F11H_V26M/СН1_L11W	Ск_F11H_V26M	СН1_L11W
Ск/СН1_084	Ск_F11H_V26W/СН1_L11W	Ск_F11H_V26W	СН1_L11W
Ск/СН1_085	Ск_F11L_V26R/СН1_L11W	Ск_F11L_V26R	СН1_L11W
Ск/СН1_086	Ск_F11R_V26L/СН1_L11W	Ск_F11R_V26L	СН1_L11W
Ск/СН1_087	Ск/СН1_L11I_L28F	Ск	СН1_L11I_L28F
Ск/СН1_088	Ск/СН1_L11R_L28P	Ск	СН1_L11R_L28P
Ск/СН1_089	Ск/СН1_L11I_L28Q	Ск	СН1_L11I_L28Q
Ск/СН1_090	Ск/СН1_L11R_L28G	Ск	СН1_L11R_L28G

Ск/CH1_091	Ск/CH1_L11R_L28D	Ск	CH1_L11R_L28D
Ск/CH1_092	Ск/CH1_L11K_L28N	Ск	CH1_L11K_L28N
Ск/CH1_093	Ск/CH1_L11T_L28H	Ск	CH1_L11T_L28H
Ск/CH1_094	Ск/CH1_L28T	Ск	CH1_L28T
Ск/CH1_095	Ск/CH1_L11A_L28R	Ск	CH1_L11A_L28R
Ск/CH1_096	Ск/CH1_L11E_L28Q	Ск	CH1_L11E_L28Q
Ск/CH1_097	Ск_F11W_V26K/CH1	Ск_F11W_V26K	CH1
Ск/CH1_098	Ск_F11H_V26R/CH1	Ск_F11H_V26R	CH1
Ск/CH1_099	Ск_F11W_V26G/CH1	Ск_F11W_V26G	CH1
Ск/CH1_100	Ск_F11H_V26L/CH1	Ск_F11H_V26L	CH1
Ск/CH1_101	Ск_F11R_V26Y/CH1	Ск_F11R_V26Y	CH1
Ск/CH1_102	Ск_F11R_V26E/CH1	Ск_F11R_V26E	CH1
Ск/CH1_103	Ск_F11H_V26M/CH1	Ск_F11H_V26M	CH1
Ск/CH1_104	Ск_F11H_V26W/CH1	Ск_F11H_V26W	CH1
Ск/CH1_105	Ск_F11L_V26R/CH1	Ск_F11L_V26R	CH1
Ск/CH1_106	Ск_F11R_V26L/CH1	Ск_F11R_V26L	CH1
Ск/CH1_107	Ск_V26W/CH1_L11W	Ск_V26W	CH1_L11W

**Пример 5: Улучшение пар мутаций Ск\_V26W/CH1\_L11W посредством Discovery Studio**

[00141] **Стратегия 4:** с фиксированной мутацией Ск\_V26W и CH1\_L11W вводили насыщенные точечные мутации для Ск\_F11 и CH1\_L28; затем использовали DS для вычисления всех эффективных мутаций. Получали 23 предпочтительные пары мутаций, перечисленные ниже.

мутация	энергия мутаций	эффект	ВДВ	электро-статически е	энтропия	неполяр-ные	двойная мутация
H:LEU11>TRP.L:PHE11>HIS.L:VAL26>TRP	-1,21	стабилизирующий	-3,06	0,33	0,18	0	1,17
H:LEU11>TRP.L:PHE11>ALA.L:VAL26>TRP	-0,27	нейтральный	-0,35	-0,18	0	0	4,52
H:LEU11>TRP.H:LEU28>ARG.L:VAL26>TRP	-0,78	стабилизирующий	-3,18	0,44	0,67	0	0,72
H:LEU11>TRP.H:LEU28>PRO.L:VAL26>TRP	0,42	нейтральный	-0,63	0,6	0,49	0	2,86
H:LEU11>TRP.H:LEU28>ARG.L:PHE11>CYS.L:VAL26>TRP	-0,34	нейтральный	-2,12	-0,22	0,94	0	H:0,72 L:4,06
H:LEU11>TRP.H:LEU28>ARG.L:PHE11>ILE.L:VAL26>TRP	-0,25	нейтральный	-1,76	0,41	0,48	0	H:0,72 L:2,87
H:LEU11>TRP.H:LEU28>ARG.L:PHE11>PRO.L:VAL26>TRP	-0,14	нейтральный	-1,77	-0,07	0,89	0	H:0,72 L:3,18
H:LEU11>TRP.H:LEU28>ARG.L:PHE11>ARG.L:VAL26>TRP	-0,06	нейтральный	-5,26	2,92	1,26	0	H:0,72 L:3,37
H:LEU11>TRP.H:LEU28>ARG.L:PHE11>MET.L:VAL26>TRP	0,43	нейтральный	-1,35	0,13	1,18	0	H:0,72 L:2,97

### Пример 6: разработка пар мутаций

[00142] Для Пары 2 для каждого остатка на интерфейсе тестировали одиночные мутации - аланин/триптофан. Конструировали IgG(-Fv) без VH и VL, и экспрессировали для скрининга Ala и Trp. Перечень мутаций приведен ниже.

Название	Описание	Ск	СН1
Ск/СН1_001	Ск/СН1	Дикий тип	Дикий тип
Ск/СН1_002	Ск L28Y S69W/СН1 H51A F53G	L28Y S69W	H51A F53G
Ск/СН1_003	Ск/СН1 H51A F53G	Дикий тип	H51A F53G
Ск/СН1_004	Ск/СН1 D31K F53T V68F	Дикий тип	D31K F53T V68F
Ск/СН1_005	Ск/СН1 F9A F53A	Дикий тип	F9A F53A
Ск/СН1_006	Ск F9G F11A K100A/СН1	F9G F11A K100A	Дикий тип
Ск/СН1_007	Ск F11A/СН1	F11A	Дикий тип
Ск/СН1_008	Ск F9A F11A/СН1	F9A F11A	Дикий тип
Ск/СН1_009	Ск F11A K100A/СН1	F11A K100A	Дикий тип
Ск/СН1_010	Ск F9A K100A/СН1	F9A K100A	Дикий тип
Ск/СН1_011	Ск/СН1 F9A L11A	Дикий тип	F9A L11A
Ск/СН1_012	Ск/СН1 L11A F53A	Дикий тип	L11A F53A
Ск/СН1_013	Ск/СН1 F9A	Дикий тип	F9A
Ск/СН1_014	Ск/СН1 L11A	Дикий тип	L11A
Ск/СН1_015	Ск F9A/СН1	F9A	Дикий тип
Ск/СН1_016	Ск F9A F11M/СН1	F9A F11M	Дикий тип
Ск/СН1_017	Ск/СН1 A24F	Дикий тип	A24F
Ск/СН1_018	Ск/СН1 A24L	Дикий тип	A24L
Ск/СН1_019	Ск F9A F11A/СН1 A24F	F9A F11A	A24F
Ск/СН1_020	Ск F9A F11A/СН1 A24L	F9A F11A	A24L
Ск/СН1_021	Ск F9A F11M/СН1 A24F	F9A F11M	A24F
Ск/СН1_022	Ск F9A F11M/СН1 A24L	F9A F11M	A24L
Ск/СН1_023	Ск V26A/СН1	V26A	Дикий тип
Ск/СН1_024	Ск V26A F11A/СН1	V26A F11A	Дикий тип
Ск/СН1_025	Ск/СН1 L11F L28G	Дикий тип	L11F L28G
Ск/СН1_026	Ск V26A/СН1 L11F L28G	V26A	L11F L28G
Ск/СН1_027	Ск V26A F11A/СН1 L11F L28G	V26A F11A	L11F L28G
Ск/СН1_028	Ск/СН1 A24W	Дикий тип	A24W
Ск/СН1_029	Ск/СН1 L11F	Дикий тип	L11F
Ск/СН1_030	Ск/СН1 L11W	Дикий тип	L11W
Ск/СН1_031	Ск F9A F11A/СН1 L11F A24F	F9A F11A	L11F A24F
Ск/СН1_032	Ск V26W/СН1	V26W	Дикий тип

### Пример 7: изменение солевых мостиков

[00143] Анализ взаимодействий на интерфейсе для Ск и СН1 в примере 1 продемонстрировал, что общий солевой мостик между СН1 и Ск 1F8, 1CZ8, 1L7I и 4NYL представлен ниже:

СН1			Ск			Расстояние (Å)
Положение	Остаток	Название атома	Положение	Остаток	Название атома	
96	LYS	NZ	16	GLU	OE2	2,7-3,4

[00144] В 1F8 и 1CZ8 присутствует еще один солевой мостик:

СН1	Ск	Расстояние (Å)

Положение	Остаток	Название атома	Положение	Остаток	Название атома	
101	LYS	NZ	15	ASP	OD2	2,7-3,8

**[00145]** Соответственно, этот пример направлен на CH1 и Ck 1F8 с двумя солевыми мостиками и в нем использовали Discovery Studio для создания новых пар солевых мостиков в CH1 и Ck, которые не благоприятствуют связыванию мутированного CH1 или Ck с партнером дикого типа и которые восстанавливают связывание между мутированным CH и Ck с новым солевым мостиком.

**[00146]** Создание солевого мостика CH1\_LYS96 и Ck\_GLU16. Как показано в таблице ниже, две пары демонстрировали стабилизацию CH1<sup>мут</sup> и Ck<sup>мут</sup> с новым солевым мостиком:

CH1: мутация LYS96>ASP и Ck: мутация GLU16>ARG;

CH1: мутация LYS96>GLU и Ck: мутация GLU16>ARG;

Мутация	Энергия мутаций	Эффект	ВДВ	Электро-статические	Энтропия	Неполярные	Одиночная мутация
H:LYS96>ASP.L:GLU16>ARG	-1,06	Стабилизирующий	-2,86	1,02	-0,16	0	1,02 1,32
H:LYS96>GLU.L:GLU16>ARG	-0,52	Стабилизирующий	-2,38	0,98	0,21	0	1,28 1,32
H:LYS96>ASP.L:GLU16>LYS	-0,41	Нейтральный	-2,06	1,08	0,09	0	1,02 1,84
H:LYS96>GLU.L:GLU16>HIS	0,12	Нейтральный	-0,24	1,74	-0,72	0	1,28 0,79
H:LYS96>GLU.L:GLU16>LYS	0,26	Нейтральный	-1,6	1,43	0,39	0	1,28 1,84

**[00147]** Discovery Studio также использовали для поиска нового солевого мостика, который мог бы проявлять синергию с новыми Ck\_V26W и CH1\_L11W и не благоприятствовать связыванию мутированного CH1 или Ck с партнером дикого типа, и восстанавливать связывание между мутированным CH и Ck. Как показано в таблицах ниже: три пары демонстрировали стабилизацию CH1<sup>мут</sup> и Ck<sup>мут</sup> синергично с Ck\_V26W и CH1\_L11W:

CH1: LEU11>TRP; мутация LYS96>GLU и Ck: GLU16>LYS; мутация VAL26>TRP

CH1: LEU11>TRP; мутация LYS96>GLU и Ck: GLU16>ARG; мутация VAL26>TRP

CH1: LEU11>TRP; мутация LYS101>GLU и Ck: ASP15>LYS; мутация VAL26>TRP

**Таблица 5: мутации в CH1\_K96/Ck\_E16**

Мутация	Энергия мутаций	Эффект	ВДВ	Электро-статические	Энтропия	Неполярные	Двойная мутация
---------	-----------------	--------	-----	---------------------	----------	------------	-----------------

H:LEU11> TRP.H:LYS96>GLU. L:GLU16> LYS.L:VAL26>TRP	-1,06	Стабилизи- рующий	-4,09	1,61	0,2	0	-0,34 3,39
H:LEU11> TRP.H:LYS96>GLU. L:GLU16> ARG.L:VAL26>TRP	-0,57	Стабилизи- рующий	-1,6	1,94	-0,84	0	-0,34 2,03
H:LEU11> TRP.H:LYS96>GLU. L:GLU16> HIS.L:VAL26>TRP	-0,5	Нейтральный	-0,79	2,11	-1,32	0	-0,34 1,11

**Таблица 6: мутации в CH1\_K101/Ск\_D15**

мутация	Энергия мутаций	Эффект	ВДВ	Электро- статические	Энтропия	непо- лярные	Двойная мутация
H:LEU11> TRP.H:LYS101>GLU L:ASP15> LYS.L:VAL26>TRP	-0,65	Стабилизи- рующий	-2,28	2,18	-0,68	0	0,58 1,57
H:LEU11> TRP.H:LYS101>GLU. L:ASP15> HIS.L:VAL26>TRP	-0,06	Нейтральный	-1,66	2,08	-0,31	0	0,58 1,66
H:LEU11> TRP.H:LYS101>ASP. L:ASP15> LYS.L:VAL26>TRP	0,27	Нейтральный	1,33	1,91	-1,53	0	0,62 1,57
H:LEU11> TRP.H:LYS101>ASP. L:ASP15> ARG.L:VAL26>TRP	0,44	Нейтральный	1,46	1,96	-1,44	0	0,62 1

### Пример 8: тестирование измененных солевых мостиков

**[00148]** Конструировали плазмиды, содержащие полинуклеотиды, кодирующие CH1-CH2-CH3 или Ск. В некоторые домены вводили мутации, перечисленные ниже.

**[00149]** Плазмиды временно трансфицировали в клетки 293F для экспрессии белка. Белки очищали с использованием колонок с белком А и аффинного геля anti-FLAG, и очищенные белки анализировали путем SDS-ПААГ (5 мкг на дорожку). Поскольку белок А связывается только с тяжелой цепью, плотность легких цепей указывала на силу связывания между тяжелой цепью и легкой цепью.

**[00150]** В первой партии тестировали 13 антител. Мутации, включенные в эти антитела, перечислены в таблице 7.

**Таблица 7: тестируемые антитела с мутациями**

№	Название белка	CH1-CH2CH3	Ск
1	Ск/CH1_001	Дикий тип	Дикий тип
2	Ск/CH1_200	Дикий тип	E16R

3	Ск/СН1_201	К96D	Дикий тип
4	Ск/СН1_202	К96E	Дикий тип
5	Ск/СН1_203	К96D	E16R
6	Ск/СН1_204	К96E	E16R
7	Ск/СН1_107	L11W	V26W
8	Ск/СН1_205	L11W; K96E	Дикий тип
9	Ск/СН1_206	Дикий тип	E16K; V26W
10	Ск/СН1_207	L11W; K96E	E16K; V26W
11	Ск/СН1_208	L11W; K96D	Дикий тип
12	Ск/СН1_209	Дикий тип	V26W; E16R
13	Ск/СН1_210	L11W; K96D	V26W; E16R

**[00151]** Результаты представлены на **фиг.6А**. Хорошее связывание наблюдали для Ск/СН1\_001 (дикий тип) и Ск/СН1\_107 (L11W в СН1 и V26W в Ск). Ск/СН1\_203 содержала пару мутаций положительная-на-отрицательную и отрицательная-на-положительную, которая разрушала солевой мостик дикого типа (K96-E16). Связывание в Ск/СН1\_210 (L11W и K96D в СН1, и V26W и E16R в Ск) было значительно более сильным, чем между K96D и E16R. Каждая из мутантных цепей, напротив, более очевидно была не способна связываться с партнером дикого типа (см. Ск/СН1\_208 и Ск/СН1\_209).

**[00152]** Мутантные цепи в Ск/СН1\_207, СН1 с L11W и K96E, и Ск с E16K и V26W также демонстрировали большее связывание в мутантах, чем партнеры дикого типа (см. Ск/СН1\_205 и Ск/СН1\_206).

**[00153]** Во второй партии тестировали семь антител. Мутации, включенные в эти антитела, перечислены в **таблице 8**.

**Таблица 8: тестируемые антитела с мутациями**

	Название белка	СН1-СН2СН3	Ск
1	Ск/СН1_001	Дикий тип	Дикий тип
2	Ск/СН1_211	Дикий тип	E16K
3	Ск/СН1_202	K96E	Дикий тип
4	Ск/СН1_212	K96E	E16K
5	Ск/СН1_205	L11W, K96E	Дикий тип
6	Ск/СН1_209	Дикий тип	E16R, V26W
7	Ск/СН1_213	L11W, K96E	E16R, V26W

**[00154]** Результаты представлены на **фиг.6В**. Мутантные цепи в Ск/СН1\_213, СН1 с L11W и K96E, и Ск с E16R и V26W демонстрировали большее связывание в мутантах, чем партнеры дикого типа (см. Ск/СН1\_205 и Ск/СН1\_206).



**[00155]** В третьей партии тестировали пятнадцать антител. Мутации, включенные в эти антитела, перечислены в **таблице 9**.

**Таблица 9: тестируемые антитела с мутациями**

№	Название белка	СН1-СН2СН3	Ск
1	Ск/СН1_001	Дикий тип	Дикий тип
2	Ск/СН1_030	L11W	Дикий тип
3	Ск/СН1_032	Дикий тип	V26W
4	Ск/СН1_107	L11W	V26W
5	Ск/СН1_201	K96D	Дикий тип
6	Ск/СН1_214	Дикий тип	C16R, Q17A
7	Ск/СН1_217	K96D	E16R, Q17A
8	Ск/СН1_208	L11W, K96D	Дикий тип
9	Ск/СН1_225	Дикий тип	E16R, Q17A, V26W
10	Ск/СН1_226	L11W, K96D	E16R, Q17A, V26W
11	Ск/СН1_221	Дикий тип	D15K, V26W
12	Ск/СН1_222	Дикий тип	D15H, V26W
13	Ск/СН1_220	L11W, K101E	Дикий тип
14	Ск/СН1_223	L11W, K101E	D15K, V26W
15	Ск/СН1_224	L11W, K101E	D15H, V26W

**[00156]** Как показано на **фиг.6С**, восстановленные солевые мостики в Ск/СН1\_223 (K101E-D15K) и Ск/СН1\_224 (K101E-D15H) обуславливали сильные взаимодействия между мутированными тяжелыми и легкими цепями, и каждый из них отдельно был более очевидно неспособен связывать партнер дикого типа по сравнению с Ск/СН1\_107 (L11W в СН1 и V26W в Ск). Сильное связывание между мутантами, как показано на указанной фигуре, также основано на гидрофобном взаимодействии между L11W и V26W. Другими словами, синергия между гидрофобным взаимодействием и новым солевым мостиком обуславливает сильное связывание и высокую специфичность, которые будут полезны для разработки полиспецифических антител.

#### **Пример 9: конструирование биспецифического антитела**

**[00157]** Для дополнительной оценки влияния мутаций СН1/Ск на ошибочное спаривание легкой цепи авторы настоящего изобретения использовали формат IgG-подобного гетеродимерного биспецифического антитела путем использования мутаций DE/EE в СН3-домене (J. Biol. Chem. (2017) 292(35) 14706–14717). Авторы настоящего изобретения конструировали биспецифические антитела путем использования пары PDL1/CD73.

**[00158]** Разработка пары PDL1/CD73 описана в таблице ниже:

Блок	B5021	B5022	B5023	B5024
------	-------	-------	-------	-------

CH3	DE/КК		DE/КК		DE/КК		DE/КК	
Fab	PDL1	CD73	PDL1	CD73	PDL1	CD73	PDL1	CD73
CH1	K96D	L11W	K96D	Дикий тип	L11W/K96D	Дикий тип	L11W/K96E	Дикий тип
Ск	E16K	V26W	E16K	Дикий тип	V26W/E16R	Дикий тип	V26W/E16K	Дикий тип

**[00159]** Как показано на **фиг.8А**, все разработанные пары не влияли на связывание PDL1-части по данным ELISA, в то время как эффективность связывания CD47 была снижена. Мутации Ск/CH1\_207 (CH1:L11W/K96E; Ск: E16K/V26W) B5024 и мутации Ск/CH1\_210 (CH1:L11W/K96D; Ск: E16R/V26W) B5023 могут восстанавливать связывание CD73-части антигена по данным ELISA. Кроме того, анализ передачи сигнала PDL1 и анализ ферментативной активности CD73 демонстрировали схему, схожую со связыванием ELISA (**фиг.8В**). В этом отношении вся PDL1-часть демонстрировала схожую антагонистическую активность в отношении PDL1, и только B5024 и B5023 демонстрировали сильную антагонистическую активность в отношении CD73. В этой паре легкая цепь PDL1 в значительной степени нарушала функцию CD73-плеча, в то время как легкая цепь CD73 мало влияла на PDL1-плечо. Мутации как Ск/CH1\_207, так и Ск/CH1\_210 могли восстанавливать функцию CD73 и не влияли на PDL1-плечо, что позволяет предположить, что мутации CH1/Ск могут предотвращать ошибочное спаривание легкой цепи.

\* \* \*

**[00160]** Объем настоящего изобретения не ограничивается конкретными описанными вариантами реализации, которые представлены в качестве индивидуальных иллюстраций отдельных аспектов настоящего изобретения, и любые композиции или способы, которые являются функционально эквивалентными, включены в объем настоящего изобретения. Для специалиста в данной области техники очевидно, что в способах и композициях согласно настоящему изобретению могут быть произведены различные модификации и вариации в пределах существа или объема настоящего изобретения. Соответственно, настоящее изобретение охватывает модификации и вариации настоящего изобретения, если они входят в объем прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов.

**[00161]** Содержание всех публикаций и заявок на патент, упомянутых в настоящем описании, включено в настоящее описание посредством ссылки так же, как если бы содержание каждой индивидуальной публикации или заявки на патент было специально включено отдельно.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий СН1-фрагмент человека, содержащий замену L11W, и Ск-фрагмент человека, содержащий замену V26W.
2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, отличающийся тем, что СН1-фрагмент содержит замены L11W и K101E, и Ск-фрагмент содержит замены V26W и D15K/H.
3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, отличающийся тем, что СН1-фрагмент содержит замены L11W и K96D, и Ск-фрагмент содержит замены V26W и E16R.
4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, отличающийся тем, что СН1-фрагмент содержит замены L11W и K96E, и Ск-фрагмент содержит замены V26W и E16K.
5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, отличающийся тем, что СН1-фрагмент содержит замены L11W и K96E, и Ск-фрагмент содержит замены V26W и E16R.
6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, дополнительно содержащий второй СН1-фрагмент человека, который не содержит замену L11W, и второй Ск-фрагмент человека, который не содержит замену V26W.
7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6, отличающийся тем, что второй СН1-фрагмент человека и второй Ск-фрагмент человека относятся к дикому типу.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-7, дополнительно содержащий вариабельную область тяжелой цепи, вариабельную область легкой цепи, Fc-область или их комбинацию.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 8, который относится к классу IgG.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 9, отличающийся тем, что изотип представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий пару CH1-фрагмент человека - Cκ-фрагмент человека, при этом указанные CH1- и Cκ-фрагменты содержат замены, выбранные из группы, состоящей из:

(a) L11K и L28N в CH1 и V26W в Cκ;

(b) L11W в CH1 и F11W и V26G в Cκ;

(c) F9D в CH1 и Q17R или Q17K в Cκ; и

их комбинаций.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 10, отличающийся тем, что CH1- и Cκ-фрагменты дополнительно содержат замены, выбранные из группы, состоящей из: (a) K101E в CH1 и D15K/H в Cκ, (b) K96D в CH1 и E16R в Cκ, (c) K96E в CH1 и E16K в Cκ, и (d) K96E в CH1 и E16R в Cκ.

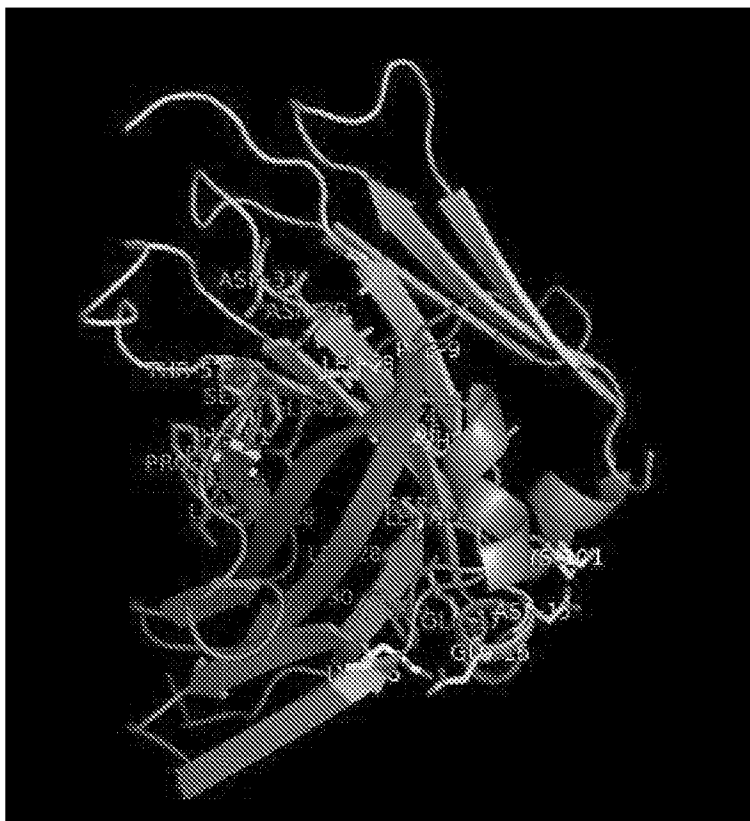
13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий CH1-фрагмент человека, содержащий замену аминокислоты в положении Leu11, и Cκ-фрагмент человека, содержащий замену аминокислоты в положении V26 и/или F11, при этом указанные замены аминокислот взаимодействуют друг с другом, когда CH1-фрагмент спаривается с Cκ-фрагментом.

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 13, отличающийся тем, что СН1-фрагмент человека не взаимодействует с Ск-доменом человека дикого типа, и Ск-домен человека не взаимодействует с СН1-фрагментом человека дикого типа.
15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 13, отличающийся тем, что замены аминокислот выбраны из таблицы 1.
16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий СН1-фрагмент человека, содержащий замену аминокислоты в положении F9, и Ск-фрагмент человека, содержащий замену аминокислоты в положении Q17, при этом указанные замены аминокислот взаимодействуют друг с другом, когда СН1-фрагмент спаривается с Ск-фрагментом.
17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 16, отличающийся тем, что СН1-фрагмент не взаимодействует с Ск-фрагментом человека дикого типа, и Ск-фрагмент не взаимодействует с СН1-фрагментом человека дикого типа.
18. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 16, отличающийся тем, что замены аминокислот выбраны из таблицы 2.
19. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 10-18, дополнительно содержащий вариабельную область тяжелой цепи, вариабельную область легкой цепи, Fc-область или их комбинацию.
20. Биспецифическое антитело, содержащее первую пару СН1/Ск и вторую пару СН1/Ск, при этом СН1- и Ск-фрагменты первой пары содержат замены аминокислот L11W в СН1 и V26W в Ск, и СН1- и Ск-фрагменты второй пары не содержат замен L11W и V26W.

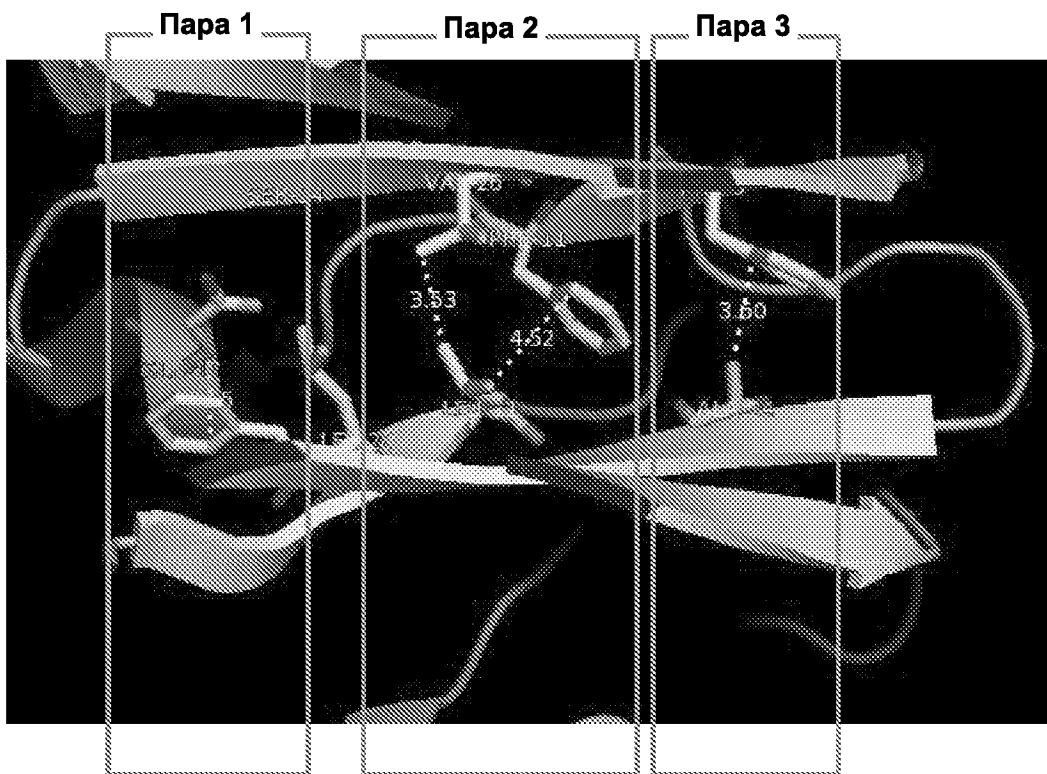
21. Биспецифическое антитело по п. 20, отличающееся тем, что СН1- и Ск-фрагменты первой пары дополнительно содержат замены, выбранные из группы, состоящей из: (а) К101Е в СН1 и D15К/Н в Ск, (b) К96D в СН1 и E16R в Ск и (с) К96Е в СН1 и E16К в Ск, и СН1- и Ск-фрагменты второй пары не содержат замен (а)-(с).

22. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-21 и фармацевтически приемлемый носитель.

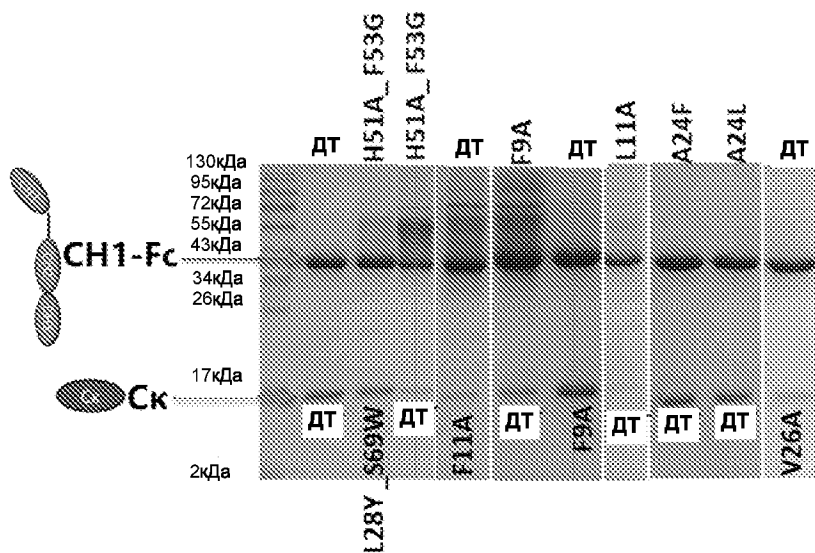
23. Выделенная клетка, содержащая один или более полинуклеотидов, кодирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-21.



**ФИГ. 1**

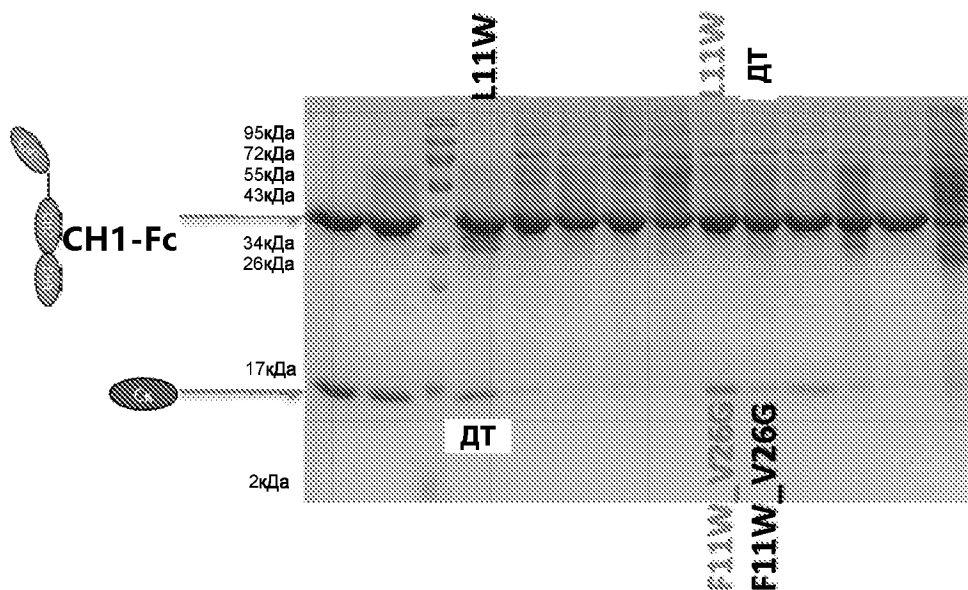


ФИГ. 2

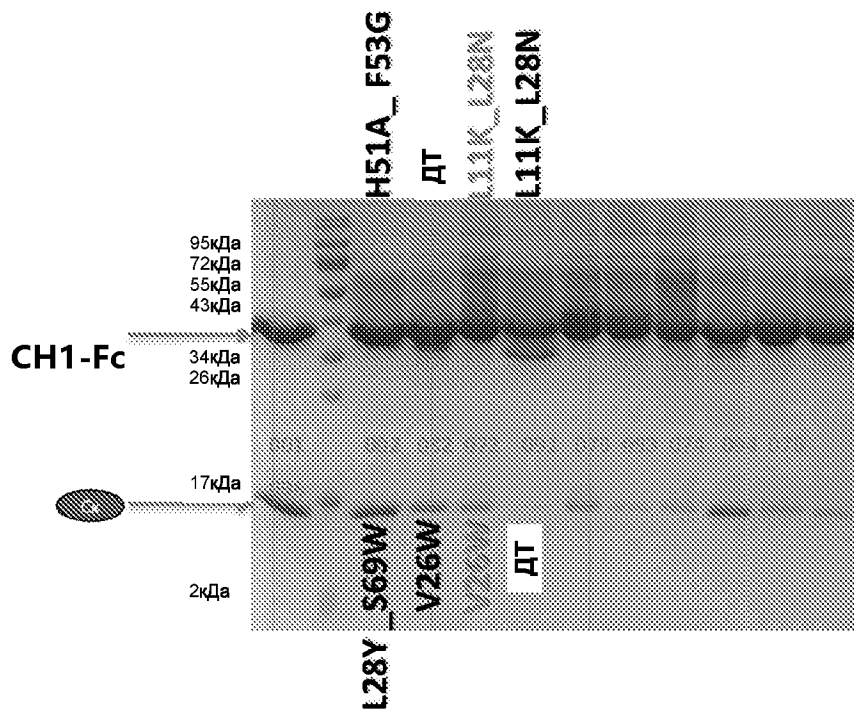


ФИГ. 3

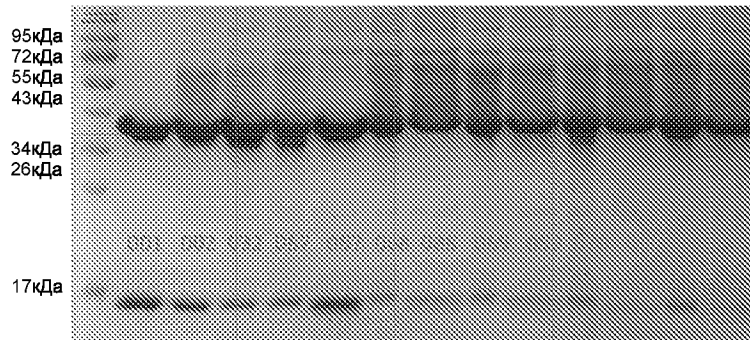




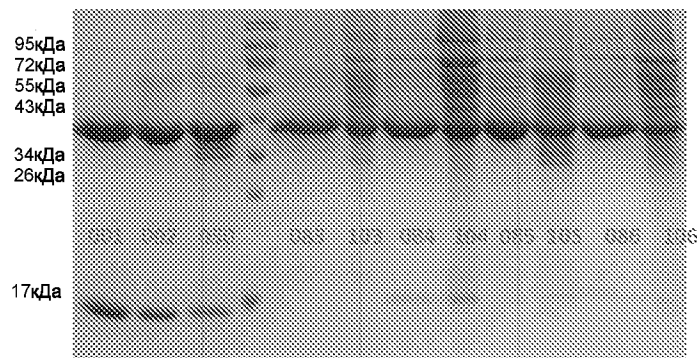
ФИГ. 4А



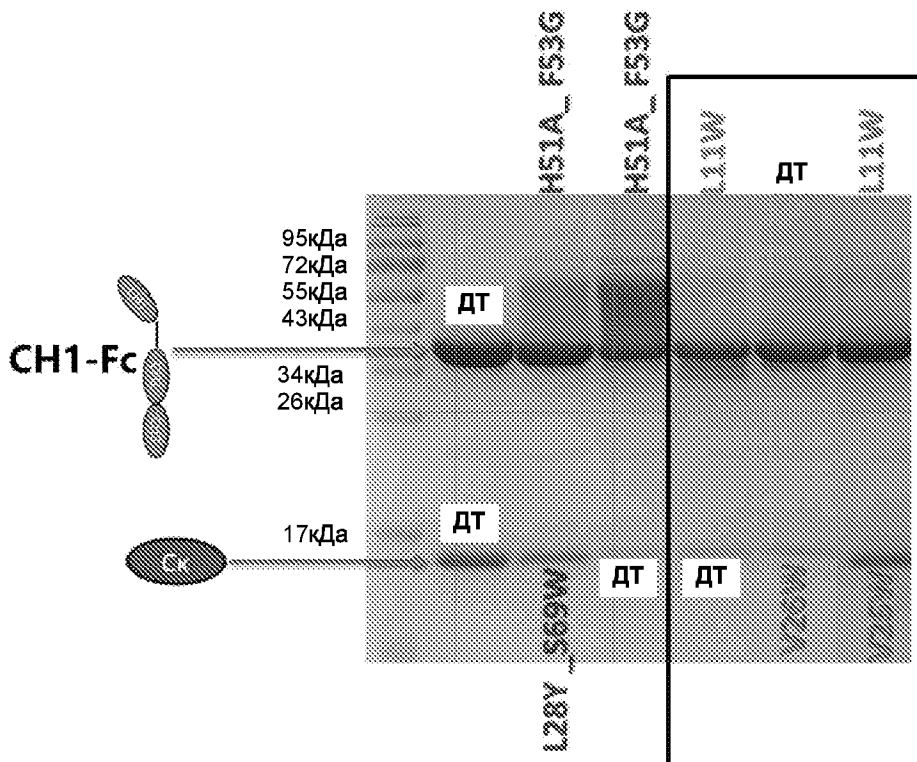
ФИГ. 4В



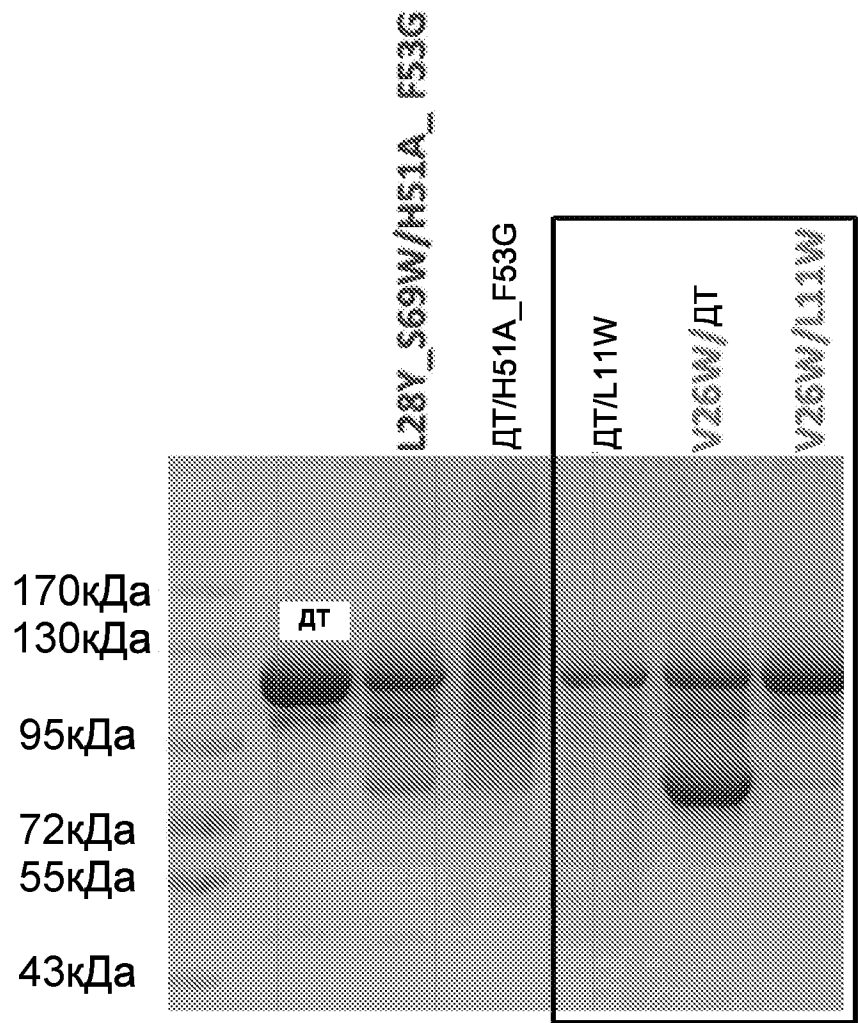
**ФИГ. 4С**



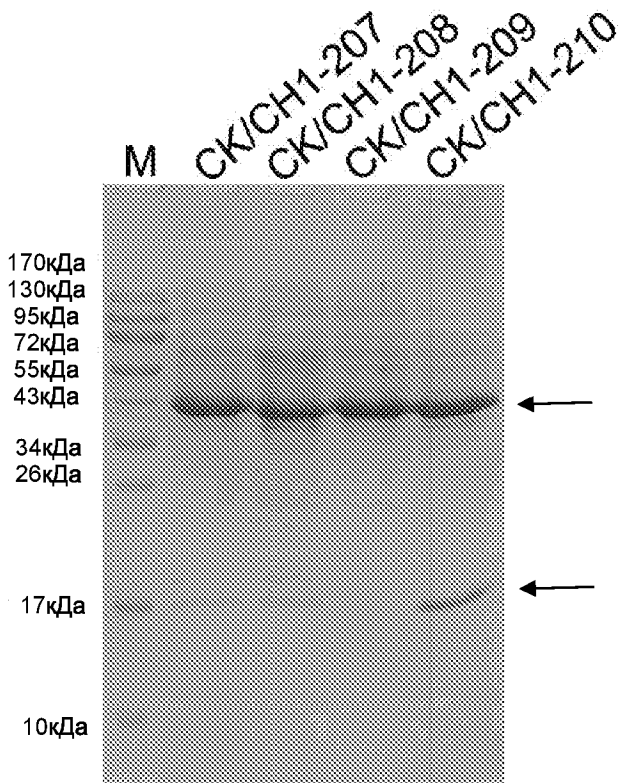
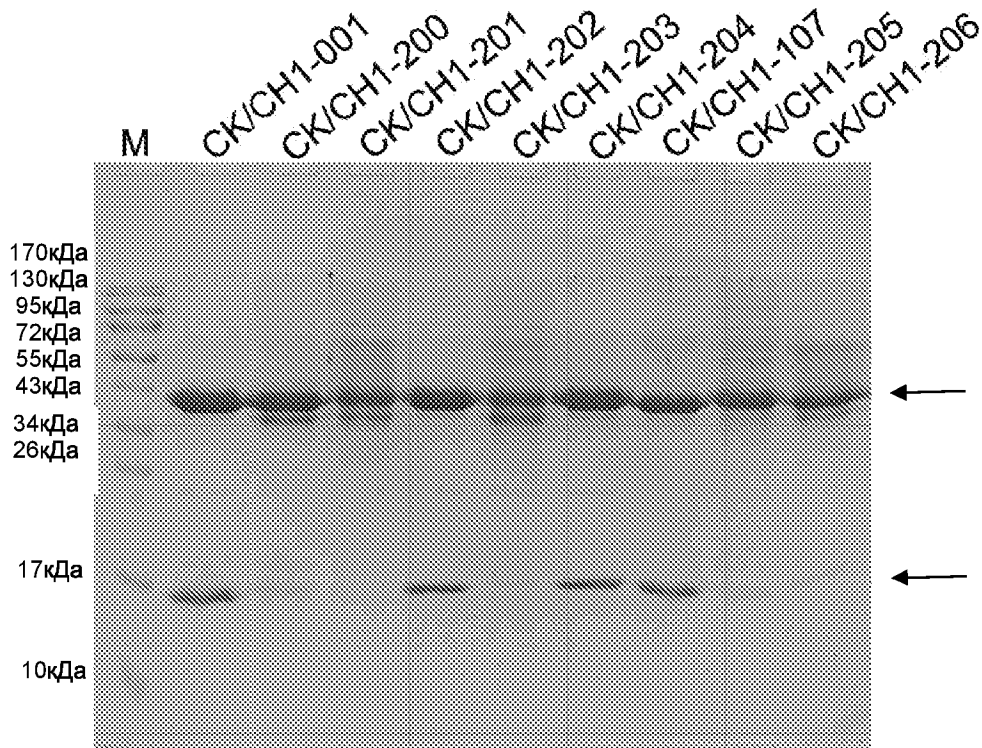
**ФИГ. 4D**



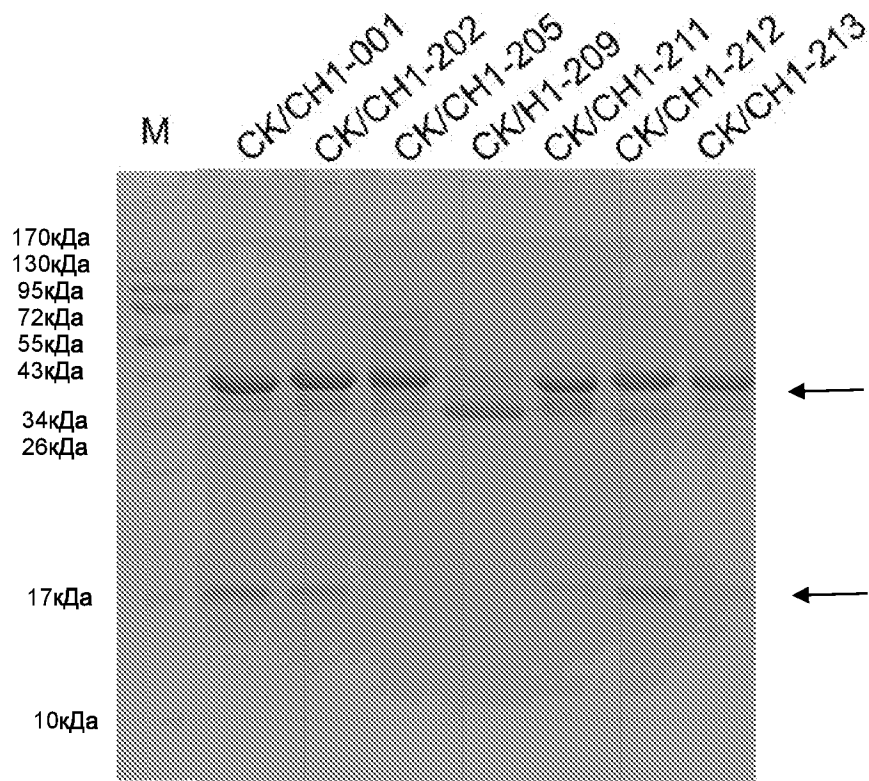
ФИГ. 5А



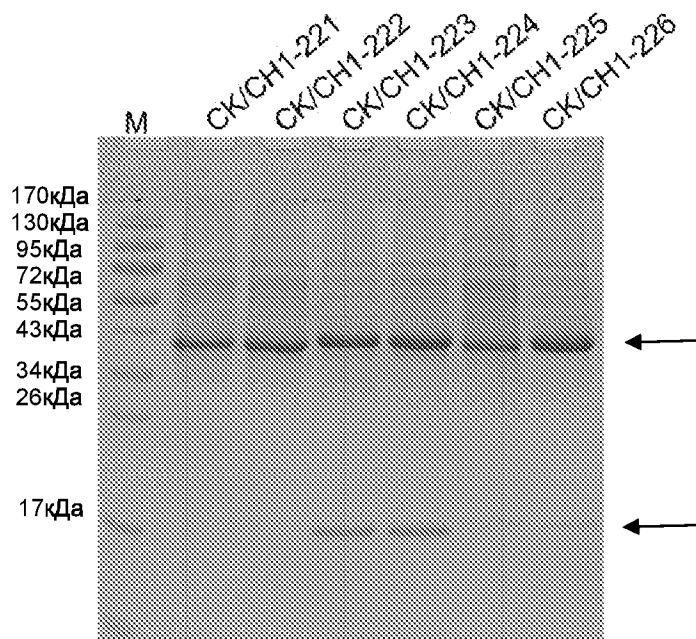
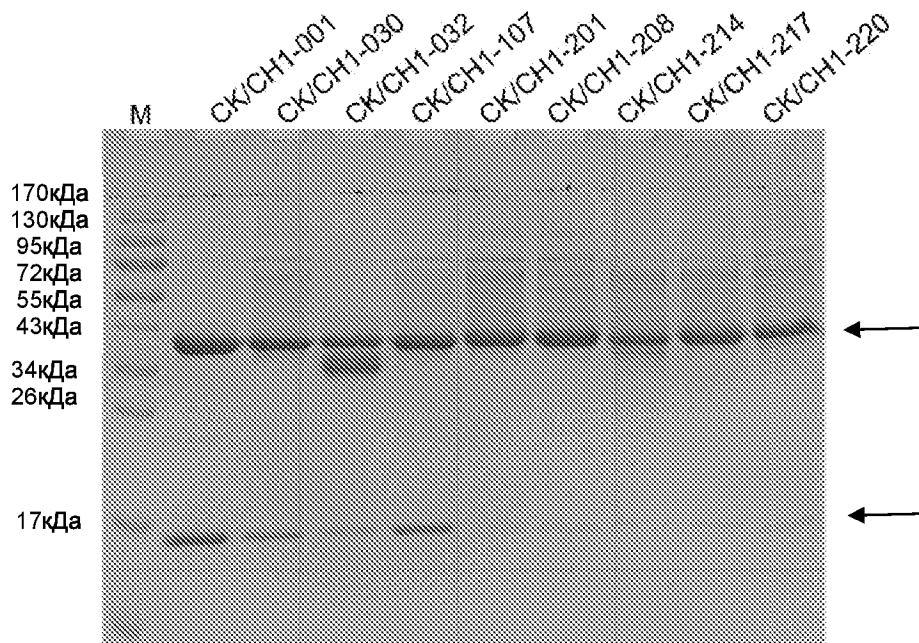
**ФИГ. 5В**



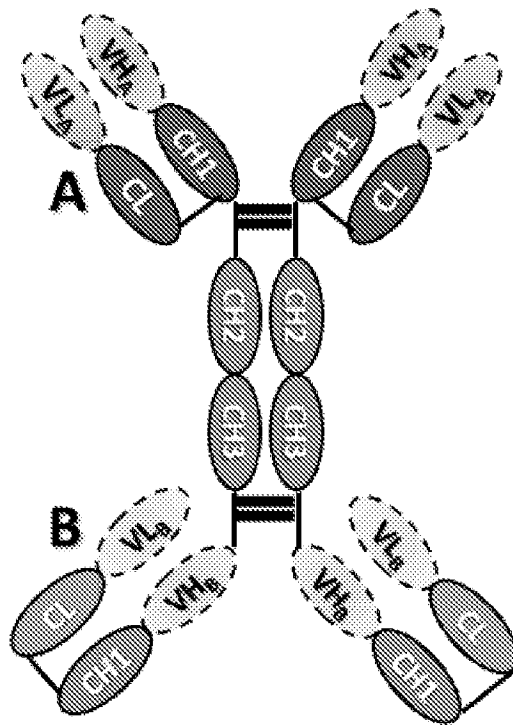
**ФИГ. 6А**



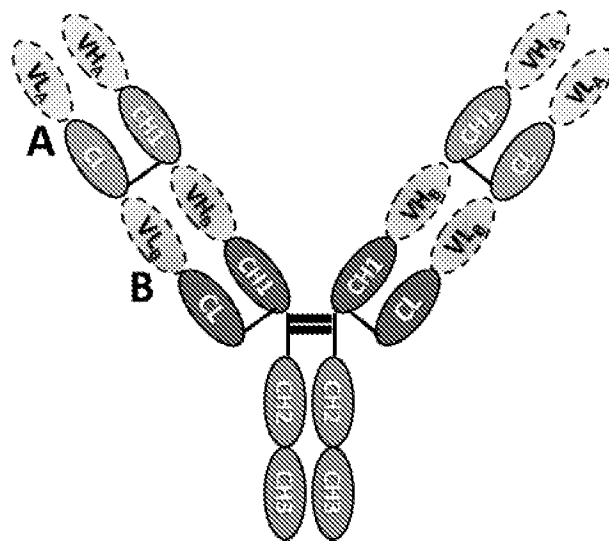
**ФИГ. 6В**



**ФИГ. 6С**

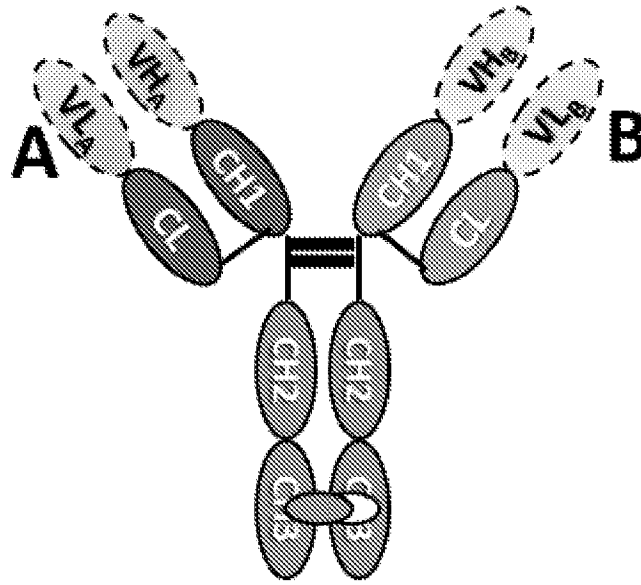


ФИГ. 7А

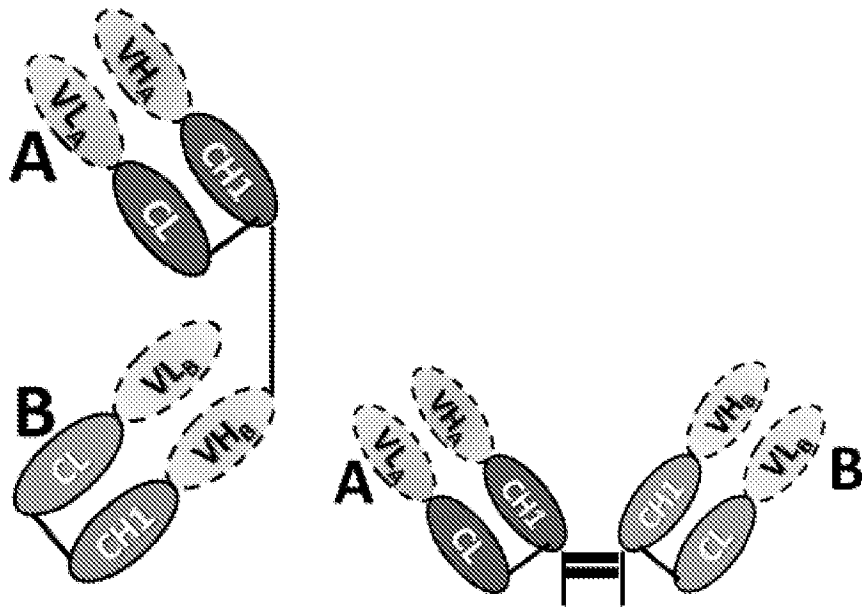


ФИГ. 7В



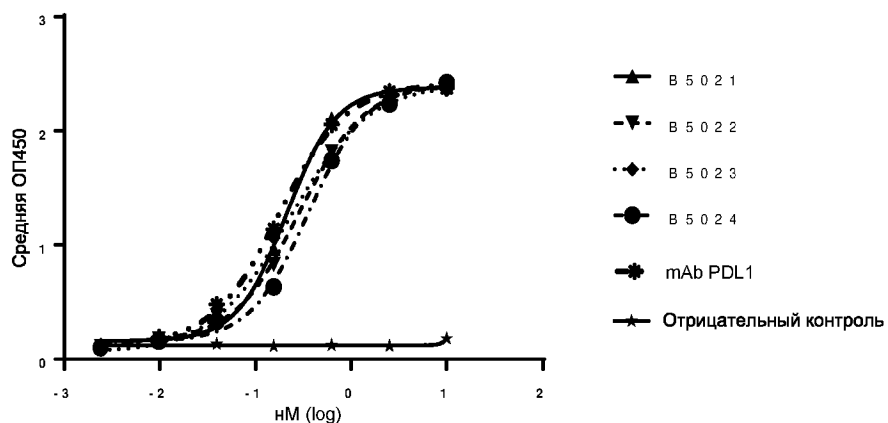


ФИГ. 7С



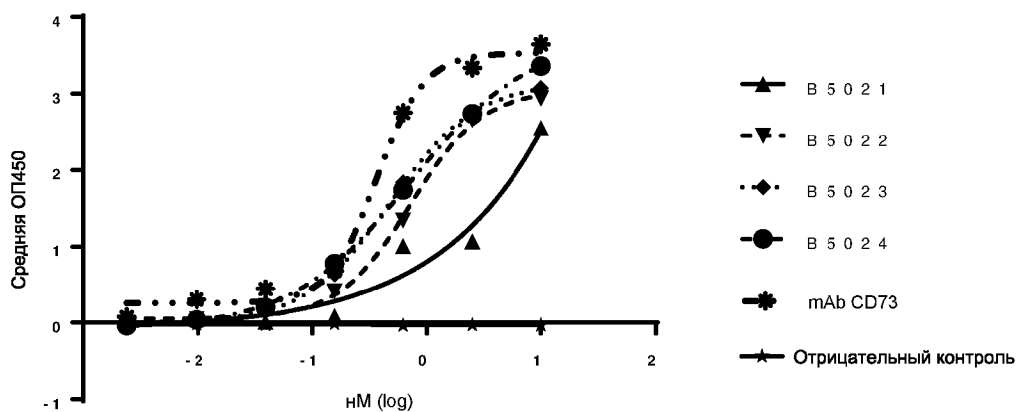
ФИГ. 7D

ELISA связывания PDL1/his



	B5021	B5022	B5023	B5024	PDL1 mAb	Отрицат. контроль
EC50	0.2119	0.287	0.2287	0.3596	0.1771	~ 19.84

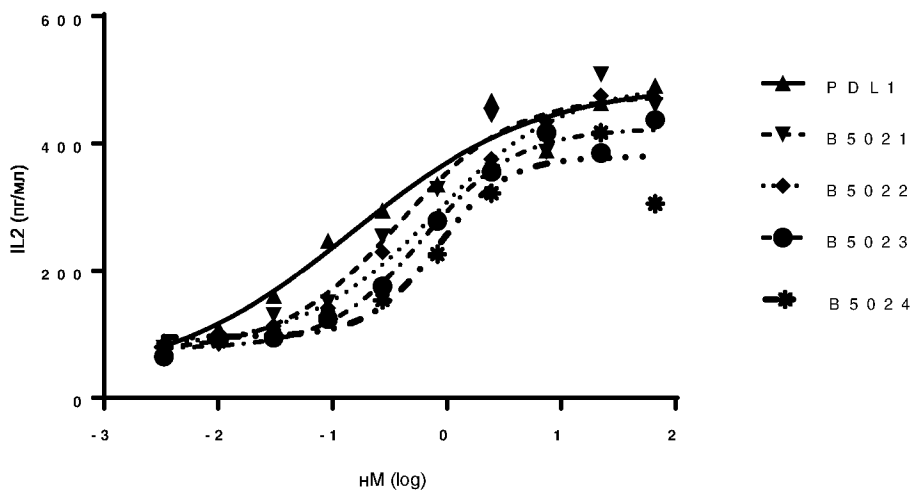
ELISA связывания CD73/his



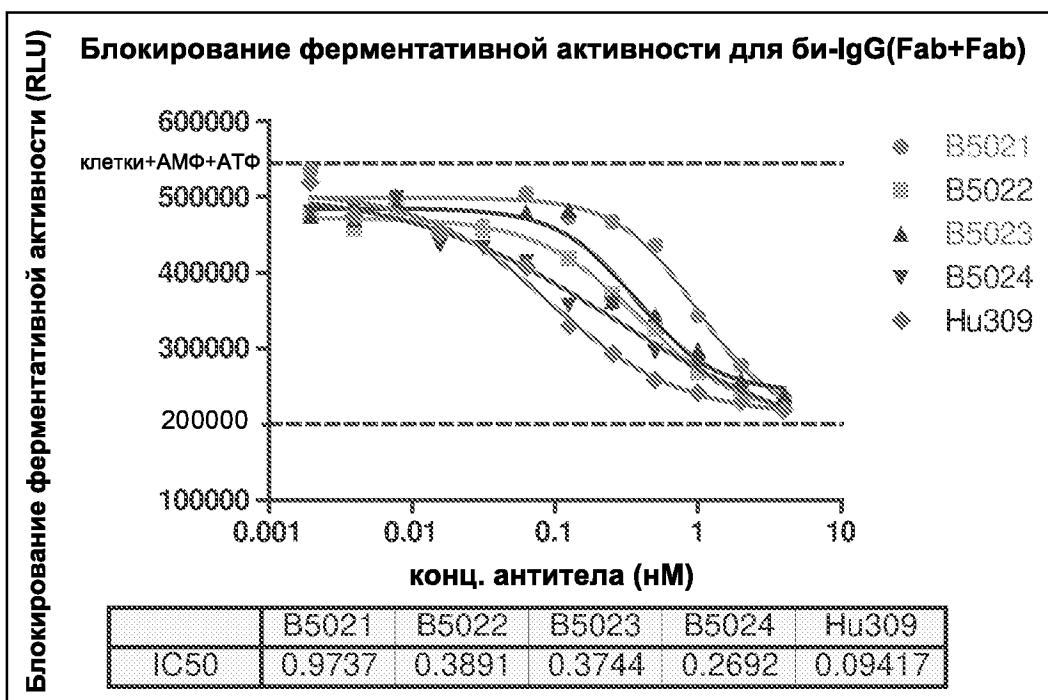
	B5021	B5022	B5023	B5024	mAb CD73
EC50	~ 14914168	0.7277	0.4819	0.7064	0.3689

**ФИГ. 8А**

Анализ передачи сигнала PDL1



	PDL1	B5021	B5022	B5023	B5024
EC50	0.146	0.3806	0.7682	0.6173	0.8203



ФИГ. 8В