

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091422** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2020.08.28

(22) Дата подачи заявки
2018.12.11

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)
B01D 15/14 (2006.01)

(54) **СПОСОБ НЕПРЕРЫВНОГО ПРОИЗВОДСТВА ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ
БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ**

(31) 62/597,250

(32) 2017.12.11

(33) US

(86) PCT/US2018/064901

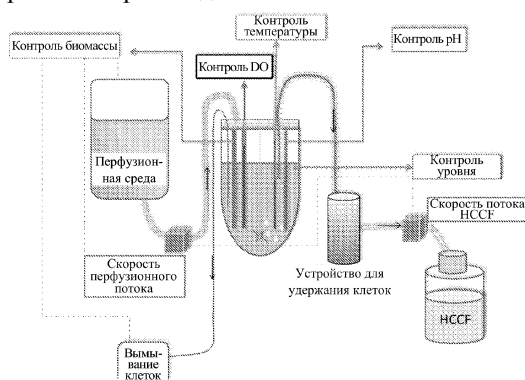
(87) WO 2019/118426 2019.06.20

(71) Заявитель:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Годар Четан, Дешпенд Роухини,
Гомес Наталия, Бархордарьян Хедье,
Ван Янь (US)

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

(57) В настоящем изобретении предусмотрен способ непрерывного производства на этапе накопления для получения продуктов на основе биспецифических антител, содержащих по меньшей мере два связывающих домена. Способ включает, по меньшей мере, стадии (i) обеспечения в перфузионном биореакторе по меньшей мере одной культуры клеток млекопитающих, которая способна экспрессировать продукт на основе биспецифического антитела, (ii) выращивания культуры клеток млекопитающих при первой скорости перфузии до момента достижения заданного значения плотности жизнеспособных клеток и (iii) поддержания перфузионной культуры при второй скорости перфузии, где концентрацию продукта на основе биспецифического антитела в биореакторе поддерживают ниже порогового значения. Затем продукт на основе биспецифического антитела подвергают последующей обработке на этапе выделения и очистки. Более того, в настоящем изобретении предусмотрен продукт на основе биспецифического антитела, полученный с помощью способа непрерывного производства на этапе накопления.



A1

202091422

202091422

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-562596EA/042

СПОСОБ НЕПРЕРЫВНОГО ПРОИЗВОДСТВА ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к способам биотехнологии, в частности, к способам непрерывного производства, предназначенным для производства биспецифических антител.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Одними из наиболее быстро и многообещающе развивающихся терапевтических средств являются фармацевтические препараты на основе белка, которые уже играют важную роль практически во всех областях медицины и являются одними из самых востребованных терапевтических средств в (до)клинической разработке и в качестве коммерческих продуктов. (Leader, Nature Reviews Drug Discovery 2008 Jan 7, 21-39). По сравнению с лекарственными средствами на основе малых молекул белковые фармацевтические препараты обладают высокой специфичностью и активностью при относительно низких концентрациях и, как правило, предназначены для терапии заболеваний, значительно снижающих качество жизни, таких как различные виды рака, аутоиммунные заболевания и нарушения обмена веществ. (Roberts, Trends Biotechnol. 2014 Jul;32(7):372-80, Wang, Int J Pharm. 1999 Aug 20;185(2):129-88).

В настоящее время фармацевтические препараты на основе белков, таких как рекомбинантные белки, могут быть получены с высокой степенью чистоты при их первичном изготовлении, благодаря достижениям в способах очистки в промышленном масштабе. Однако белки обладают низкой степенью стабильности и даже во время производства на этапе накопления в высокой степени подвержены деградации, как химической, так и физической. Химическая деградация относится к модификациям, в которые вовлечены ковалентные связи, таким как дезамидирование, окисление, расщепление или образование новых дисульфидных связей, гидролиз, изомеризация или дегликозилирование. Физическая деградация включает разворачивание белка, нежелательную адсорбцию на поверхностях и агрегацию. Решение проблем, обусловленных такими физической и химической нестабильностью, является одной из наиболее сложных задач при разработке белковых фармацевтических препаратов. (Chi et al., Pharm Res, Vol. 20, No. 9, Sept 2003, pp. 1325-1336, Roberts, Trends Biotechnol. 2014 Jul;32(7):372-80).

Соответственно, несмотря на достижения в производстве, для новых фармацевтических препаратов на основе белка требуется новый оптимизированный способ производства с целью недопущения негативного воздействия на качество продукта, как, например, агрегации белка. Оно затрагивает производство на этапе накопления, производство на этапе выделения и очистки, хранение и применение.

Такие новые фармацевтические препараты на основе белков содержат, например,

биспецифические (моноклональные) антитела. Биспецифическое антитело представляет собой искусственный белок, который может одновременно связываться с двумя различными типами антигена. Они известны в нескольких структурных форматах, и к настоящему времени исследовались варианты их применения для иммунотерапии рака и доставки лекарственных средств (Fan, Gaowei; Wang, Zujian; Hao, Mingju; Li, Jinming (2015). "Bispecific antibodies and their applications". Journal of Hematology & Oncology. 8: 130).

В целом биспецифические антитела могут относиться к биспецифическим антителам IgG-типа, т. е. полноразмерным, или к биспецифическим антителам, отличным от IgG-типа, которые являются конструкциями не на основе полноразмерных антител. Полноразмерные биспецифические антитела, как правило, сохраняют традиционную структуру моноклонального антитела (mAb) из двух Fab-плеч и одного Fc-участка, за исключением того, что два Fab-сайта связываются с различными антигенами. У неполноразмерных биспецифических антител полностью отсутствует Fc-участок. Они включают химически связанные Fab-участки, состоящие из Fab-участков одного вида, и различные типы двухвалентных и трехвалентных одноцепочечных вариабельных фрагментов (scFv). Существуют также слитые белки, имитирующие вариабельные домены двух антител. По-видимому, наиболее разработанными из этих новых форматов являются биспецифические рекрутеры Т-клеток (BiTE[®]) (Yang, Fa; Wen, Weihong; Qin, Weijun (2016). "Bispecific Antibodies as a Development Platform for New Concepts and Treatment Strategies". International Journal of Molecular Sciences. 18 (1): 48).

Биспецифические молекулы, такие как конструкции на основе BiTE[®]-антител, представляют собой рекомбинантные белковые конструкции, составленные из двух полученных из антитела связывающих доменов, соединенных гибкой связью. Один связывающий домен конструкций на основе BiTE[®]-антител является специфическим для выбранного опухолеассоциированного поверхностного антигена на клетках-мишенях; второй связывающий домен является специфическим для CD3, субъединицы Т-клеточного рецепторного комплекса на Т-клетках. Благодаря своей особенной структуре конструкции на основе BiTE[®]-антител уникальным образом подходят для временного соединения Т-клеток с клетками-мишенями и, в то же самое время, эффективно активируют цитолитический потенциал, присущий Т-клеткам, против клеток-мишеней. Важным дальнейшим усовершенствованием конструкций на основе BiTE[®]-антител первого поколения (см. WO 99/54440 и WO 2005/040220), введенных в клинику как AMG 103 и AMG 110, было получение конструкций на основе биспецифических антител, связывающихся с независимым от окружения эпитопом на N-конце цепи CD3ε (WO 2008/119567). Конструкции на основе BiTE[®]-антител, связывающиеся с этим выбранным эпитопом, демонстрируют не только межвидовую специфичность к цепи CD3ε человека и *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* или *Saimiri sciureus*, но также за счет распознавания данного специфического эпитопа вместо ранее описанных эпитопов для связывающих CD3 молекул в биспецифических молекулах, рекрутирующих Т-клетки, они не приводят к неспецифической активации Т-клеток в той же степени, как это наблюдалось у

предыдущего поколения антител, рекрутирующих Т-клетки. Это снижение активации Т-клеток было связано с меньшим или сниженным перераспределением Т-клеток у пациентов, что было определено как риск возникновения побочных эффектов.

В настоящее время, биспецифические антитела получают с помощью способов производства с применением периодической культуры с подпиткой. Периодическая культура с подпиткой хорошо известна как производственная методика в биотехнологических способах, при которой одно или несколько питательных веществ (субстратов) подаются (подводятся) в биореактор во время культивирования и при которой продукт(-ы) остаются в биореакторе до конца цикла. (Tsuneo Yamanè, Shoichi Shimizu: Fed-batch Techniques in Microbial Processes. (1984) *Advances in Biochem Eng./Biotechnol*, 30:147-194). Соответственно, продукты на основе биспецифических антител накапливаются во время способа периодического культивирования с подпиткой и проявляют тенденцию к потере качества продукта, например, вследствие агрегации, усечения или определенных реакций химической деградации. К тому же, продукт не может быть получен до конца цикла. Кроме того, связанные со способом примеси, такие как белки клетки-хозяина (НСР), аналогичным образом накапливаются в биореакторе во время способа периодического культивирования с подпиткой. Извлечение таких примесей на этапе выделения и очистки зачастую является сложной задачей и требует дополнительных мер и ресурсов для обеспечения качества конечного продукта. Поскольку в каждом новом цикле требуется новая фаза выращивания культуры клеток, общая продуктивность периодического культивирования с подпиткой является сниженной из-за указанных требуемых повторяющихся фаз выращивания. Более того, чтобы достичь достаточного количества продукта, получаемого в установках периодического культивирования с подпиткой, требуются большие биореакторы, которые занимают большое пространство и потребляют большое количество энергии. Следовательно, существует потребность в улучшенном способе производства на этапе накопления, в частности, в способе получения биспецифических антител, который повышает как количество продукта, так и качество продукта, с целью обеспечения достаточных количеств продукта в коммерческом масштабе при таком качестве, что меньше продукта требуется отбрасывать при обработке на этапе выделения и очистки. Ценными являются новые способы обработки, которые обеспечивают даже поэтапные улучшения в продуцировании и извлечении рекомбинантного белка, с учетом стоимости крупномасштабных способов культивирования клеток и растущего спроса на большие количества биологических продуктов, которые будут предоставляться пациентам с серьезными неудовлетворенными медицинскими потребностями, и более низкие затраты при их получении.

Краткое описание

Неожиданно оказалось, что адаптированный способ непрерывного производства может обеспечить как гарантированное увеличение количество продукта на основе биспецифического антитела, так и улучшение качества продукта. Хотя способы непрерывного производства для получения белков, таких как антитела, были известны как

таковые (например, Cattaneo et al., US 2017/0204446 A1), такие способы не были адаптированы для специфических потребностей биспецифических антител, которые имеют тенденцию к агрегации, усечению и химической деградации уже во время стадий способа производства на этапе накопления, что приводит к уменьшению количества и снижению качества продукта.

Следовательно, в одном аспекте в контексте настоящего изобретения предусматривается обеспечение способа непрерывного производства на этапе накопления для получения продукта на основе биспецифического антитела, содержащего по меньшей мере первый и второй связывающий домен, где первый связывающий домен связывается с мишенью, отличной от мишени второго связывающего домена, при этом способ включает стадии:

(i) обеспечения жидкой среды для культивирования клеток, содержащей по меньшей мере одну культуру клеток млекопитающих, в перфузионном биореакторе, где культура клеток млекопитающих способна экспрессировать продукт на основе биспецифического антитела, и где клетки характеризуются концентрацией, составляющей по меньшей мере $0,5 \times 10^6$ клеток/мл в момент инокуляции в перфузионный биореактор,

(ii) выращивания культуры клеток млекопитающих путем применения скорости перфузии (D) для замены жидкой среды для культивирования клеток предпочтительно непрерывным образом без удаления клеток из биореактора, где скорость перфузии первоначально соответствует меньшей мере 0,4 объема сосуда в день (vvd), а затем увеличивается непрерывно, постепенно или пошагово до по меньшей мере 1 объема биореактора, что также понимается в данном документе как объем сосуда в день (vvd), когда достигается заданное значение биомассы, при этом заданное значение биомассы равно плотности жизнеспособных клеток (VCD), составляющей по меньшей мере 35×10^6 клеток/мл,

(iii) поддержания перфузионной культуры путем применения скорости перфузии (D) для непрерывной или пошаговой замены жидкой среды для культивирования клеток, предпочтительно без удаления клеток из биореактора, когда достигается заданное значение биомассы, где скорость перфузии на стадии (iii) соответствует по меньшей мере 1 объему биореактора, что также понимается в данном документе как объем сосуда в день (vvd), и

(iv) необязательно вымывания лишних клеток из биореактора для поддержания заданного значения биомассы,

где концентрацию продукта на основе биспецифического антитела в биореакторе поддерживают ниже 3,5 г/л путем непрерывного сбора продукта на основе биспецифического антитела из жидкой среды для культивирования клеток на всем протяжении стадий (ii) - (iv) и/или путем регулирования D по VCD.

В соответствии с указанным аспектом также предусматривается, что на стадии (i) клетки характеризуются концентрацией, составляющей по меньшей мере 1×10^6 клеток/мл в момент инокуляции в биореактор.

В соответствии с указанным аспектом дополнительно предусматривается, что на

стадии (ii) заданное значение биомассы равно VCD, составляющей по меньшей мере 65×10^6 клеток/мл.

В соответствии с указанным аспектом еще более предусматривается, что на этапе (ii) заданное значение биомассы равно VCD, составляющей по меньшей мере 71×10^6 клеток/мл.

В соответствии с указанным аспектом также предусматривается, что на стадии (ii) выращивание культуры клеток происходит в течение по меньшей мере 4 дней, предпочтительно в течение по меньшей мере 7 дней, предпочтительно в течение по меньшей мере 12 дней.

В соответствии с указанным аспектом дополнительно предусматривается, что на стадии (ii) скорость перфузии (D) находится в диапазоне от 0,4 до 7 vvd.

В соответствии с указанным аспектом дополнительно предусматривается, что на стадии (ii) скорость перфузии (D) возрастает непрерывно, т. е. не дискретно.

В соответствии с указанным аспектом предусматривается в еще большей степени, что на стадии (iii) скорость перфузии (D) находится в диапазоне от 1 до 7 vvd.

В соответствии с указанным аспектом также предусматривается, что на стадии (iii) скорость перфузии (D) находится в диапазоне от 2 до 6,4 vvd, предпочтительно составляет 2 vvd, наиболее предпочтительно составляет 2,01 vvd.

В соответствии с указанным аспектом дополнительно предусматривается, что на стадии (iii) скорость перфузии (D) представляет собой удельную скорость перфузии (CSPR) в диапазоне от 0,01 до 0,15 нл/клетка-день (нл на клетку в день), предпочтительно в диапазоне от 0,015 до 0,0315 нл/клетка-день или в диапазоне от 0,05 до 0,1 нл/клетка-день.

В соответствии с указанным аспектом также предусматривается, что на стадиях (ii) - (iv) концентрация продукта на основе биспецифического антитела поддерживается ниже 1,2 г/л, предпочтительно ниже 0,5 г/л, наиболее предпочтительно ниже 0,12 г/л.

В соответствии с указанным аспектом также предусматривается, что среднее время пребывания продукта на основе биспецифического антитела в биореакторе перед сбором после стадии (iii) или (iv) соответственно составляет не более 2 дней, предпочтительно не более 1 дня, наиболее предпочтительно не более 0,5 дня.

В соответствии с указанным аспектом также предусматривается, что конечная IVCD составляет по меньшей мере 10×10^6 клеток-день/мл, предпочтительно по меньшей мере 12, 20 или 50×10^6 клеток-день/мл, более предпочтительно по меньшей мере 100, 500 или даже 1000×10^6 клеток-день/мл.

В соответствии с указанным аспектом также предусматривается, что средняя продуктивность HCCF составляет по меньшей мере 2 г/л объема биореактора, предпочтительно по меньшей мере 5, 10 или 15 г/л объема биореактора.

В соответствии с указанным аспектом также предусматривается, что средняя суточная продуктивность HCCF составляет по меньшей мере 10 г/л объема биореактора в день, предпочтительно по меньшей мере 50 г/л объема биореактора в день, более предпочтительно по меньшей мере 100 или даже по меньшей мере 250 г/л объема

биореактора в день.

В соответствии с указанным аспектом также дополнительно предусматривается, что процентное содержание мономера в выделенном продукте на основе биспецифического антитела составляет по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 93% или даже 95%.

В соответствии с указанным аспектом также дополнительно предусматривается, что процентное содержание высокомолекулярных разновидностей (HMW) в выделенном продукте на основе биспецифического антитела составляет не более 50%, предпочтительно не более 40%, более предпочтительно не более 30%, 20%, 10%, 7% или даже 5%.

В соответствии с указанным аспектом продукт на основе биспецифического антитела, который получают в соответствии с настоящим изобретением, характеризуется по меньшей мере 60% снижением содержания белков клетки-хозяина в пуле первой или второй очистки по сравнению с тем же пулом, полученным в способе периодического культивирования с подпиткой, предпочтительно по меньшей мере 65%, как правило, по меньшей мере 68% или даже от 75% до 86%.

В соответствии с указанным аспектом продукт на основе биспецифического антитела, который получают в соответствии с настоящим изобретением, характеризуется по меньшей мере 40% снижением уровней усеченного белка в пуле первой или второй очистки по сравнению с тем же пулом, полученным в способе периодического культивирования с подпиткой, предпочтительно по меньшей мере 44%, как правило, по меньшей мере 75% или даже 97%.

В соответствии с указанным аспектом процентное содержание продукта, полученного в соответствии с настоящим изобретением, который подвергся усечению, составляет не более 15% или 10%, предпочтительно не более 7%, более предпочтительно не более 6, 5, 4, 3, 2 или 1% и наиболее предпочтительно не более 0,3%. Последнее предпочтительно относится к биспецифическому антителу в соответствии с настоящим изобретением, которое не является полноразмерным антителом и предпочтительно содержит второй домен, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 202.

В соответствии с указанным аспектом продукт на основе биспецифического антитела, который получают в соответствии с настоящим изобретением, характеризуется по меньшей мере 50% снижением уровней химически модифицированных аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 65%, более предпочтительно по меньшей мере 68% или даже по меньшей мере 80% снижением уровня химически модифицированных аминокислот в продукте, как, например, дезамидированных или изомеризованных разновидностей в продукте, например, в пуле первой или второй очистки по сравнению с тем же пулом, полученным в способе периодического культивирования с подпиткой

В соответствии с указанным аспектом продукт на основе биспецифического антитела, который получают в соответствии с настоящим изобретением, характеризуется процентным содержанием дезамидированных или изомеризованных разновидностей в

продукте, составляющим не более 2%, предпочтительно не более 1%, более предпочтительно не более 0,5% или даже 0,1% относительно всех разновидностей продукта.

В соответствии с указанным аспектом продукт на основе биспецифического антитела, который получают в соответствии с настоящим изобретением, характеризуется по меньшей мере 25% снижением содержания высокомолекулярных разновидностей, т. е. конструкций, имеющих более высокую молекулярную массу, чем чистый мономер продукта, предпочтительно по меньшей мере 50% или даже приблизительно 70% снижением содержания высокомолекулярных разновидностей в пуле первой или второй очистки по сравнению с тем же пулом, полученным в способе периодического культивирования с подпиткой.

В соответствии с указанным аспектом продукт на основе биспецифического антитела, который получают в соответствии с настоящим изобретением, характеризуется снижением уровней кислотных разновидностей, предпочтительно по меньшей мере 30%, предпочтительно по меньшей мере 35, как правило, от приблизительно 38 до 49%, как правило, в пуле первой или второй очистки по сравнению с тем же пулом, полученным в способе периодического культивирования с подпиткой.

В соответствии с указанным аспектом продукт на основе биспецифического антитела, который получают в соответствии с настоящим изобретением, характеризуется процентным содержанием кислотных разновидностей в продукте, составляющим не более 15% относительно всех разновидностей продукта, предпочтительно не более 12%, более предпочтительно не более 10%.

В соответствии с указанным аспектом также предусматривается, что продукт на основе биспецифического антитела представляет собой биспецифическое полноразмерное антитело, т. е., как правило, антитело, содержащее 2 тяжелые и 2 легкие цепи, или конструкцию на основе неполноразмерного биспецифического антитела, включая конструкции на основе одноцепочечных биспецифических антител.

В соответствии с указанным аспектом предусматривается биспецифическое полноразмерное антитело, в котором первый и/или второй связывающий домен конструкции на основе биспецифического антитела связывается с мишенью и/или эффекторной клеткой.

В соответствии с указанным аспектом предусматривается биспецифическое полноразмерное антитело, в котором первый и/или второй связывающий домен конструкции на основе биспецифического антитела связывается с T11A и/или с TNF-альфа.

В соответствии с указанным аспектом также предусматривается, что конструкция на основе биспецифического антитела содержит увеличивающий период полувыведения фрагмент, предпочтительно увеличивающий период полувыведения фрагмент на основе Fc, полученный из антитела IgG, наиболее предпочтительно увеличивающий период полувыведения фрагмент в виде scFc.

В соответствии с указанным аспектом дополнительно предусматривается, что

конструкция на основе биспецифического антитела представляет собой биспецифический рекрутер Т-клеток (BiTE®).

В соответствии с указанным аспектом предусматривается, что первый связывающий домен продукта на основе биспецифического антитела связывается с по меньшей мере одним поверхностным антигеном клетки-мишени, выбранным из группы, состоящей из CD19, CD33, EGFRvIII, MSLN, CDH19, FLT3, DLL3, CDH3, BCMA и PSMA.

В соответствии с указанным аспектом дополнительно предусматривается, что второй связывающий домен конструкции на основе биспецифического антитела связывается с CD3-связывающим доменом.

В соответствии с указанным аспектом также предусматривается, что второй связывающий домен содержит VH-участок, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-участок, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из группы, состоящей из:

(a) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 1, CDR-H2, приведенного под SEQ ID NO: 2, CDR-H3, приведенного под SEQ ID NO: 3, CDR-L1, приведенного под SEQ ID NO: 4, CDR-L2, приведенного под SEQ ID NO: 5, и CDR-L3, приведенного под SEQ ID NO: 6,

(b) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 29, CDR-H2, приведенного под SEQ ID NO: 30, CDR-H3, приведенного под SEQ ID NO: 31, CDR-L1, приведенного под SEQ ID NO: 34, CDR-L2, приведенного под SEQ ID NO: 35, и CDR-L3, приведенного под SEQ ID NO: 36,

(c) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 42, CDR-H2, приведенного под SEQ ID NO: 43, CDR-H3, приведенного под SEQ ID NO: 44, CDR-L1, приведенного под SEQ ID NO: 45, CDR-L2, приведенного под SEQ ID NO: 46, и CDR-L3, приведенного под SEQ ID NO: 47,

(d) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 53, CDR-H2, приведенного под SEQ ID NO: 54, CDR-H3, приведенного под SEQ ID NO: 55, CDR-L1, приведенного под SEQ ID NO: 56, CDR-L2, приведенного под SEQ ID NO: 57, и CDR-L3, приведенного под SEQ ID NO: 58,

(e) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 62, CDR-H2, приведенного под SEQ ID NO: 63, CDR-H3, приведенного под SEQ ID NO: 64, CDR-L1, приведенного под SEQ ID NO: 65, CDR-L2, приведенного под SEQ ID NO: 66, и CDR-L3, приведенного под SEQ ID NO: 67,

(f) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 83, CDR-H2, приведенного под SEQ ID NO: 84, CDR-H3, приведенного под SEQ ID NO: 85, CDR-L1, приведенного под SEQ ID NO: 86, CDR-L2, приведенного под SEQ ID NO: 87, и CDR-L3, приведенного под SEQ ID NO: 88,

(g) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 94, CDR-H2, приведенного под SEQ ID NO: 95, CDR-H3, приведенного под SEQ ID NO: 96, CDR-L1, приведенного под SEQ ID NO: 97, CDR-L2, приведенного под SEQ ID NO: 98, и CDR-L3, приведенного под SEQ ID NO: 99,

(h) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 105, CDR-H2, приведенного под SEQ ID

NO: 106, CDR-H3, приведенного под SEQ ID NO: 107, CDR-L1, приведенного под SEQ ID NO: 109, CDR-L2, приведенного под SEQ ID NO: 110, и CDR-L3, приведенного под SEQ ID NO: 111,

(i) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 115, CDR-H2, приведенного под SEQ ID NO: 116, CDR-H3, приведенного под SEQ ID NO: 117, CDR-L1, приведенного под SEQ ID NO: 118, CDR-L2, приведенного под SEQ ID NO: 119, и CDR-L3, приведенного под SEQ ID NO: 120,

(j) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 126, CDR-H2, приведенного под SEQ ID NO: 127, CDR-H3, приведенного под SEQ ID NO: 128, CDR-L1, приведенного под SEQ ID NO: 129, CDR-L2, приведенного под SEQ ID NO: 130, и CDR-L3, приведенного под SEQ ID NO: 131,

(k) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 137, CDR-H2, приведенного под SEQ ID NO: 138, CDR-H3, приведенного под SEQ ID NO: 139, CDR-L1, приведенного под SEQ ID NO: 140, CDR-L2, приведенного под SEQ ID NO: 141, и CDR-L3, приведенного под SEQ ID NO: 142,

(l) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 152, CDR-H2, приведенного под SEQ ID NO: 153, CDR-H3, приведенного под SEQ ID NO: 154, CDR-L1, приведенного под SEQ ID NO: 155, CDR-L2, приведенного под SEQ ID NO: 156, и CDR-L3, приведенного под SEQ ID NO: 157, и

(m) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 167, CDR-H2, приведенного под SEQ ID NO: 168, CDR-H3, приведенного под SEQ ID NO: 169, CDR-L1, приведенного под SEQ ID NO: 170, CDR-L2, приведенного под SEQ ID NO: 171, и CDR-L3, приведенного под SEQ ID NO: 172.

В соответствии с указанным аспектом предусматривается, что собранный продукт на основе биспецифического антитела содержится в собранной культуральной жидкости (HCCF).

В соответствии с указанным аспектом предусматривается, что HCCF получают на стадии (ii) и (iii) или только на стадии (iii).

В соответствии с указанным аспектом предусматривается, что HCCF собирают при комнатной температуре, например, с интервалами 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120 и/или 144 часа или непрерывно, и передают на стадии этапа выделения и очистки для дальнейшей обработки, например захвата, продукта на основе биспецифического антитела.

В соответствии с указанным аспектом предусматривается, что стадии этапа выделения и очистки включают стадии хроматографии с захватом, вирусной инактивации и/или глубокой очистки.

В соответствии с указанным аспектом предусматривается, что культивирование перфузионной культуры осуществляется непрерывно в течение по меньшей мере 7 дней, предпочтительно в течение по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28 дней, наиболее предпочтительно в течение по меньшей мере 35 дней путем подпитки при определенной удельной скорости перфузии и вымывания лишних клеток из

биореактора для поддержания заданного значения биомассы.

В другом аспекте настоящего изобретения предусматривается обеспечение установки или аппарата для проведения способа непрерывного производства по настоящему изобретению, изображенных на фиг. 1, содержащих перфузионный биореактор, оснащенный по меньшей мере устройством контроля биомассы, устройством контроля DO и устройством контроля уровня, и входной канал, оснащенный устройством регулирования скорости перфузионного потока, и выпускной канал, оснащенный устройством для удержания клеток и устройством регулирования скорости потока НССФ. Установка может содержать перфузионную среду, которая закачивается при контролируемой скорости перфузионного потока (скорости перфузии) в биореактор. При этом контролируется уровень кислорода (DO), температура, pH, биомасса (емкость) и уровень жидкости (уровень). Избыток клеток можно отделять за счет вымывания клеток. Собранную культуральную жидкость (НССФ) получают путем отделения жидкости из биореактора за счет пропускания ее через устройство для удержания клеток, которое может содержать фильтр с размером пор 0,2 мкм. Предпочтительно не содержащую клеток НССФ можно собирать в сосуд для хранения перед передачей для дальнейшей обработки на этапе выделения и очистки.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен продукт на основе биспецифического антитела, полученный посредством способа непрерывного производства на этапе накопления по настоящему изобретению.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен гибридный способ из периодического культивирования с подпиткой и перфузии, который преимущественно обеспечивает продукт с характеристиками качества, сопоставимыми с таковыми, представленными в данном документе, однако, за более короткий период времени, чем СМ. Количество продукта, в свою очередь, является более низким и приблизительно сопоставимо с FB. Предпочтительным является то, что более низкая концентрация продукта в биореакторе приводит к лучшему качеству продукта, как в способе СМ в соответствии с настоящим изобретением. Однако, продолжительность культивирования клеток сводится к минимуму. Такой гибридный способ в соответствии с настоящим изобретением включает стадии способа (i) периодического культивирования с подпиткой от инокуляции до приблизительно дня 7, (ii) за которым следует короткий период перфузионного культивирования (сравнимого с СМ), предпочтительно с применением системы фильтрации с переменным тангенциальным потоком (ATF) для сбора материала. Извлечение продукта предпочтительно проводят аналогично способу СМ в соответствии с настоящим изобретением, чтобы снизить концентрацию продукта и повысить качество продукта.

Описание графических материалов

На **фигуре 1** показана одна установка для способа непрерывного производства в соответствии с настоящим изобретением. Установка содержит перфузионную среду, которая закачивается при контролируемой скорости перфузионного потока (скорости

перфузии) в биореактор. При этом контролируется уровень кислорода (DO), температура, pH, биомасса (емкость) и уровень жидкости (уровень). Избыток клеток можно отделять за счет вымывания клеток. Собранную культуральную жидкость (HCCF) получают путем отделения жидкости из биореактора за счет пропускания ее через устройство для удержания клеток, которое может содержать фильтр с размером пор 0,2 мкм. Предпочтительно не содержащую клеток HCCF можно собирать в сосуд для хранения перед передачей для дальнейшей обработки на этапе выделения и очистки.

На **фигуре 2** показана плотность жизнеспособных клеток (VCD) (10^5 клеток/мл) в зависимости от времени культивирования (A), процент жизнеспособности клеток в линии культуры клеток в зависимости от времени культивирования (B) и концентрация продукта (мг/л) в зависимости от времени культивирования (C) для периодического культивирования с подпиткой ("+") и непрерывного производства (незакрашенные кружки) конструкции на основе ViTE(R)-антитела к CD19XCD3 соответственно. Сплошная линия представляет среднее для значений CM, пунктирная линия - среднее для значений периодического культивирования с подпиткой соответственно. В обоих форматах способа использовали одну и ту же линию клеток CHO, полученную от хозяина с GS-KO.

На **фигуре 3** показана плотность жизнеспособных клеток (VCD) (10^5 клеток/мл) в зависимости от времени культивирования (A), процент жизнеспособности клеток в линии культуры клеток в зависимости от времени культивирования (B) и концентрация продукта (мг/л) в зависимости от времени культивирования (C) для периодического культивирования с подпиткой ("+") и непрерывного производства (незакрашенные кружки) конструкции на основе ViTE(R)-антитела к EGFRvIIIxCD3 соответственно. Сплошная линия представляет среднее для значений CM, пунктирная линия - среднее для значений периодического культивирования с подпиткой соответственно. В обоих форматах способа использовали одну и ту же линию клеток CHO, полученную от хозяина с дефицитом DHFR.

На **фигуре 4** показано содержание (%) мономера в продукте конструкции на основе ViTE(R)-антитела к EGFRvIIIxCD3 в образцах пермеата из CM (незакрашенные кружки) и супернатанта из FB (""). Сплошная линия представляет среднее для значений CM, пунктирная линия - среднее для значений периодического культивирования с подпиткой соответственно.

На **фигуре 5** показана плотность жизнеспособных клеток (VCD) (10^5 клеток/мл) в зависимости от времени культивирования (A), процент жизнеспособности клеток в линии культуры клеток в зависимости от времени культивирования (B) и концентрация продукта (мг/л) в зависимости от времени культивирования (C) для периодического культивирования с подпиткой ("") и непрерывного производства (незакрашенные кружки) биспецифического антитела к альфа-TNF x TL1A соответственно. Сплошная линия представляет среднее для значений CM, пунктирная линия - среднее для значений периодического культивирования с подпиткой соответственно. В обоих форматах способа использовали одну и ту же линию клеток CHO, полученную от хозяина с дефицитом DHFR.

На **фигуре 6** показана плотность жизнеспособных клеток (VCD) (10^5 клеток/мл) в

зависимости от времени культивирования (А), процент жизнеспособности клеток в линии культуры клеток в зависимости от времени культивирования (В) и концентрация продукта (мг/л) в зависимости от времени культивирования (С) для периодического культивирования с подпиткой (незакрашенные треугольники) и непрерывного производства (СМ-А: □; СМ-В: ∩, СМ-С: □; СМ-Д: □) конструкции на основе BiTE(R)-антитела к CD33 x CD3 соответственно. Заданными значениями VCD при непрерывном производстве были значения $12,8 \cdot 10^5$ (СМ-А), $32,0 \cdot 10^5$ (СМ-В), $49,2 \cdot 10^5$ (СМ-С) и $64,8 \cdot 10^5$ (СМ-Д) клеток соответственно, чтобы достичь четырех различных концентраций продукта. Средние для каждого способа обозначены с помощью сплошной, штриховой пунктирной или точечной пунктирной линий соответственно. В обоих форматах способа использовали одну и ту же линию клеток CHO (клон А), полученную от хозяина с GS-KO.

На **фигуре 7** показано содержание (%) мономера в продукте конструкции на основе BiTE(R)-антитела к CD33 x CD3 в зависимости от концентрации продукта в образцах пермеата из СМ и супернатанта из FB. Способ СМ включал четыре различные заданные значения биомассы (СМ-А: □; СМ-В: ∩, СМ-С: □; СМ-Д: □), чтобы достичь четырех различных концентраций продукта.

На **фигуре 8** показан процент фракции высокомолекулярных разновидностей (А), процент фракции низкомолекулярных разновидностей (В) и процент фракции главного пика (С) для конструкции на основе BiTE(R)-антитела к CD33 x CD3 (клон А), полученной с помощью либо периодического культивирования с подпиткой (FB), либо непрерывного производства (СМ-х) с заданными значениями VCD, составляющими $12,8 \cdot 10^5$ (СМ-А), $32,0 \cdot 10^5$ (СМ-В), $49,2 \cdot 10^5$ (СМ-С) и $64,8 \cdot 10^5$ (СМ-Д) клеток соответственно, чтобы достичь четырех различных концентраций. В обоих форматах способа использовали одну и ту же линию клеток CHO (клон А), полученную от хозяина с GS-KO.

На **фигуре 9** показана корреляция повышения содержания высокомолекулярных разновидностей (HMW, %) с повышением концентрации продукта для пяти продуктов на основе биспецифических антител, конструкции на основе BiTE®-антитела к CD33 x CD3, конструкции на основе HLE-BiTE®-антитела к CD19xCD3, конструкции на основе BiTE®-антитела к EGFRvIIIxCD3, конструкции на основе HLE-BiTE®-антитела к CD19xCD3 и конструкции на основе BiTE®-антитела к DLL3xCD3.

На **фигуре 10** показано сравнение конструкции на основе BiTE®-антитела к CD33 x CD3 (клон В линии клеток CHO) в способах FB и СМ: (А) плотность жизнеспособных клеток в зависимости от времени культивирования; (В) жизнеспособность в зависимости от времени культивирования; (С) концентрация продукта в зависимости от времени культивирования.

На **фигуре 11** показано сравнение содержания высокомолекулярных (HMW) и низкомолекулярных (LMW) разновидностей, определенного с помощью SEC, для конструкции на основе BiTE®-антитела к CD33 x CD3 (клон В) в способах FB и СМ.

На **фигуре 12** показано сравнение конструкции на основе BiTE®-антитела к CD33 x CD3 (клон В) в 10-дневном гибридном способе с 3D-1VVD и традиционном способе FB:

(А) плотность жизнеспособных клеток в зависимости от времени культивирования; (В) жизнеспособность в зависимости от времени культивирования.

На **фигуре 13** показано сравнение конструкции на основе HLE-BiTE®-антитела к ВСМА x CD3 в способах FB и CM: (А) плотность жизнеспособных клеток в зависимости от времени культивирования; (В) жизнеспособность в зависимости от времени культивирования; (С) концентрация продукта в зависимости от времени культивирования.

На **фигуре 14** показано сравнение BiTE®-HLE к DLL3 x CD3 в способах FB и CM: (А) плотность жизнеспособных клеток в зависимости от времени культивирования; (В) жизнеспособность в зависимости от времени культивирования; (С) концентрация продукта в зависимости от времени культивирования.

На **фигуре 15** показано сравнение концентрации продукта и уровней HMW, определенных с помощью SEC, для образцов пермеата НССФ и супернатанта из биореактора (из культуральной жидкости) в способах CM для трех конструкций на основе BiTE®-антител на протяжении всего времени культивирования клеток (дни). Образцы отбирались из супернатанта из биореактора (незакрашенные кружки) или из пермеата НССФ в фильтре (закрашенные кружки)

Подробное описание изобретения

В данном документе предусмотрен непрерывный способ производства терапевтических белков, в частности, биспецифических антител. В настоящем изобретении предусматривается приспособить способ на этапе накопления для специальных потребностей производства биспецифических антител. Указанный способ на этапе накопления не только вносит вклад в повышение продуктивности, но и снижает требования к пространству по сравнению со стандартными решениями в периодическом производстве с подпиткой, известными из уровня техники. Более того, способ непрерывного производства по настоящему изобретению, предпочтительно представляющий собой способ непрерывного производства на этапе накопления, специально адаптирован для биспецифических антител и, как предполагается, приводит к более высокому качеству продукта, т. е. к меньшей агрегации биспецифических антител, выраженной как более высокое содержание мономера, по сравнению с периодическим производством с подпиткой. Кроме того, способ непрерывного производства по настоящему изобретению преимущественно обеспечивает меньшую химическую модификацию, меньшее усечение, меньшее содержание связанных со способом примесей в сравнении со способом периодического производства с подпиткой, известным специалисту в данной области. В качестве особого производственного преимущества выход продукта с течением времени с использованием того же типа клеток, также называемый в настоящем документе как средняя суточная продуктивность НССФ, предпочтительно увеличивается в по меньшей мере 2 раза, предпочтительно в по меньшей мере 3 раза, более предпочтительно в по меньшей мере 4 раза и еще более предпочтительно в по меньшей мере 6 раз по сравнению со способом периодического культивирования с подпиткой, известным специалисту в данной области.

Было установлено, что конкретная низкая концентрация продукта в биореакторе вносит главный вклад в предотвращение образования агрегатов, т. е. обеспечивает более высокие относительные и/или абсолютные концентрации мономера в продукте. Это является существенно важным, чтобы гарантировать качество продукта и повысить общую экономическую эффективность способа. Чем меньше агрегатов образуется на этапе накопления, тем меньше некачественного продукта необходимо удалять на этапе выделения и очистки. Концентрация продукта ниже 3,5 г/л ассоциирована с меньшей вероятностью агрегации. Качество продукта становится еще лучшим, если максимальная концентрация продукта поддерживается ниже 1,2 г/л на протяжении всего способа на этапе накопления. Еще более предпочтительной является концентрация продукта ниже 0,5 или даже 0,3 г/л. Путем обеспечения достаточно высокой скорости перфузии, составляющей 1 vvd или предпочтительно по меньшей мере 2 vvd или более, можно достичь экономически благоприятных скоростей получения продукта, предпочтительно не содержащего агрегатов. Это применимо ко всем продуктам на основе биспецифических антител, независимо от того, являются ли они полноразмерным антителом или неполноразмерным антителом, таким как конструкции на основе (одноцепочечных) биспецифических антител.

Другим неожиданным аспектом в контексте настоящего изобретения является тот факт, что адаптация скорости перфузии относительно VCD является предпочтительной для получения благоприятных качества и количества продукта в случае продуктов на основе биспецифических антител. В связи с этим скорость перфузии непрерывно, постепенно или пошагово увеличивают после инокуляции, пока не будет достигнуто предпочтительное заданное значение. Как правило, указанное заданное значение достигается, когда заданное значение биомассы равно средней плотности жизнеспособных клеток (VCD), составляющей по меньшей мере 35×10^6 клеток/мл, предпочтительно по меньшей мере 65×10^6 клеток/мл, более предпочтительно по меньшей мере 71×10^6 клеток/мл и наиболее предпочтительно по меньшей мере 85×10^6 клеток/мл. Как правило, устанавливается низкое значение скорости перфузии до тех пор, пока VCD является низкой относительно максимальной VCD, достигаемой в том же способе. Например, скорость перфузии может составлять не более приблизительно 0,4 vvd, когда VCD равна приблизительно $0,5 \times 10^6$ клеток. Однако, поскольку VCD увеличивается из-за роста клеток в биореакторе, скорость перфузии, например, можно непрерывно, постепенно или пошагово увеличивать с 0,4 vvd до 2 vvd при достижении заданного значения биомассы, составляющего, например, 35×10^6 клеток/мл. Предпочтительно, скорость перфузии увеличивается в большей степени при более высоком заданном значении биомассы. Например, можно установить значение vvd, составляющее по меньшей мере 2, предпочтительно по меньшей мере 2,01, 3, 4, 5, 6 или даже 6,4, когда заданное значение биомассы составляет, например, по меньшей мере 65×10^6 клеток/мл, более предпочтительно по меньшей мере 71×10^6 клеток/мл и наиболее предпочтительно по меньшей мере 85×10^6 клеток/мл.

Также предпочтительно, чтобы VCD поддерживалась постоянной после достижения заданного значения биомассы на стадии (iii) способа по настоящему изобретению и,

соответственно, чтобы скорость перфузии аналогично предпочтительно поддерживалась постоянной. В контексте настоящего изобретения также предусматривается, что скорость перфузии регулируется на всем протяжении способа непрерывного производства в зависимости от непрерывно измеряемой VCD. Понятно, что VCD представляет собой параметр, который является легко доступным и надежным. Интегрированная плотность жизнеспособных клеток (IVCD) понимается в данном документе как площадь под кривой для VCD в зависимости от времени. Таким образом, например, предпочтительно можно поддерживать постоянную удельную скорость перфузии (CSPR, мл на клетку в день), которая, в свою очередь, может обеспечивать контролируемую концентрацию продукта в биореакторе, чтобы избежать негативного влияния на качество продукта.

Как следствие, контролируемая и предпочтительно низкая концентрация продукта, например, предпочтительно ниже 1,2 г/л в случае полноразмерных биспецифических антител, предпочтительно ниже 0,4 г/л в случае конструкций на основе биспецифических антител-HLE и предпочтительно ниже 0,12 г/л в случае конструкций на основе биспецифических антител без HLE в соответствии с настоящим изобретением, обеспечивается на всем протяжении способа непрерывного производства на этапе накопления, что приводит к меньшему количеству продукта, подвергаемому агрегации, усечению или другой химической деградации.

CSPR понимается в контексте настоящего изобретения как отношение скорости перфузии D (объем биореактора в день) к средней VCD (C_v , т. е. среднее количество жизнеспособных клеток на мл):

$$CSPR = \frac{D}{C_v}$$

В контексте настоящего изобретения также понятно, что для клеток в культуре клеток предпочтительно обеспечивают соответствующее микроокружение, независимо от плотности клеток. Соответственно, предпочтительно среду заменяют со скоростью, пропорциональной плотности клеток. При применении скорости перфузии, исходя из предпочтительной CSPR, скорость перфузии практически соответствует плотности клеток.

В контексте настоящего изобретения CSPR может применяться автоматически с помощью пульта управления с измерением биомассы в режиме реального времени. Это предпочтительно позволяет осуществлять незначительную и/или равномерную регуляцию D в ответ на изменения C_v . Такая равномерная, т. е. непрерывная, реакция может быть предпочтительнее поэтапного, т. е. пошагового или дискретного изменения D. Минимальная CSPR представляет собой скорость, которая обеспечивает доставку минимального количества питательных веществ, удовлетворяющих потребности клеток, и поддерживает высокую продуктивность. Применение минимальной CSPR или CSPR, близкой к минимальной CSPR, имеет особое практическое значение при высоких значениях плотности клеток, например, в культурах с высокой плотностью клеток (HCDC). В контексте настоящего изобретения, например, HCDC указывает на культуру клеток с VCD, составляющей по меньшей мере 65×10^6 клеток/мл, предпочтительно по меньшей мере

71×10^6 клеток/мл или даже по меньшей мере 85×10^6 клеток/мл. Также предусматривается, что HCDC может характеризоваться VCD, составляющей по меньшей мере 100×10^6 клеток/мл.

В контексте настоящего изобретения типичная минимальная CSPR составляет 0,01 нл/клетка-день. В пределах предпочтительных границ, общих для всех биспецифических антител, для наилучшего качества продукта у некоторых из них в действительности имеются даже более предпочтительные значения. Например, в контексте настоящего изобретения CSPR для конструкции на основе BiTE®-антитела к CD19 x CD3 предпочтительно составляет менее 0,04 нл/клетка-день, более предпочтительно равна или ниже 0,028 нл/клетка-день. Для конструкций биспецифических антител, содержащих домен I2C (под SEQ ID NO 26), нацеливающихся на CD3, таких как конструкция на основе BiTE®-антитела к CD33 x CD3, CSPR предпочтительно равна или ниже 0,028 нл/клетка-день или по меньшей мере 0,051 нл/клетка-день, более предпочтительно от 0,06 до 0,1 нл/клетка-день. В случае полноразмерного биспецифического антитела, такого как биспецифическое антитело к TNF-альфа x TL1A, CSPR предпочтительно равна или ниже 0,028 нл/клетка-день или по меньшей мере 0,051 нл/клетка-день, более предпочтительно 0,06-0,1 нл/клетка-день.

В контексте настоящего изобретения под "культурой клеток" или "культурой" подразумевается рост и размножение клеток за пределами многоклеточного организма или ткани. Подходящие условия культивирования для клеток млекопитающих известны из уровня техники. См., например, *Animal cell culture: A Practical Approach*, D. Rickwood, ed., Oxford University Press, New York (1992). Клетки млекопитающих можно культивировать в суспензии или при их прикреплении к твердому субстрату.

Термин "клетка млекопитающего" означает любую клетку, полученную или происходящую от любого млекопитающего (например, человека, хомяка, мыши, зеленой мартовской кошки, крысы, свиньи, коровы или кролика). Например, клетка млекопитающего может быть immortalized клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка млекопитающего представляет собой дифференцированную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка млекопитающего представляет собой недифференцированную клетку. Неограничивающие примеры клеток млекопитающих описаны в данном документе. Предпочтительным типом клеток млекопитающих в контексте настоящего изобретения являются клетки с GS-KO. Дополнительные примеры клеток млекопитающих известны из уровня техники.

Используемый в данном документе термин "среда культивирования клеток" (также называемая "питательная среда", "среда для культуры клеток", "среда для культуры тканей") относится к любому питательному раствору, применяемому для выращивания клеток, например, клеток животных или млекопитающих, и который обычно обеспечивает по меньшей мере один или несколько компонентов из следующего: источник энергии (обычно в форме углевода, такого как глюкоза); одну или несколько из всех незаменимых аминокислот и обычно двадцать основных аминокислот плюс цистеин; витамины и/или другие органические соединения, как правило, необходимые в низких концентрациях;

липиды или свободные жирные кислоты и микроэлементы, например, неорганические соединения или встречающиеся в природе элементы, которые, как правило, требуются в очень низких концентрациях, обычно в микромолярном диапазоне.

Среды для культивирования клеток включают среды, которые, как правило, используются и/или известны для применения в любом способе культивирования клеток, таком как без ограничения периодическое, расширенное периодическое, периодическое с подпиткой и/или перфузионное или непрерывное культивирование клеток.

"Ростовая" среда для культивирования клеток или питательная среда относится к среде для культивирования клеток, которая, как правило, используется в культурах клеток во время периода экспоненциального роста, "фазы роста", и является в достаточной степени полной, чтобы поддерживать культуру клеток во время этой фазы. Ростовая среда для культивирования клеток также может содержать средства для отбора, которые обеспечивают устойчивость или выживаемость линии клеток-хозяев, с включенными в нее селектируемыми маркерами. Такие средства для отбора включают без ограничения генетицин (G4118), неомицин, гигромицин В, пурамицин, зеоцин, метионинсульфоксимин, метотрексат, среду для культивирования клеток, не содержащую глутамин, среду для культивирования клеток, в которой отсутствует глицин, гипоксантин и тимидин или только тимидин.

"Продукционная" среда для культивирования клеток или питательная среда относится к среде для культивирования клеток, которая, как правило, используется в культурах клеток во время перехода при окончании экспоненциального роста и во время последующих фаз перехода и/или продукции, когда происходит продуцирование белка. Такая среда для культивирования клеток является в достаточной степени полной, чтобы поддерживать требуемую плотность клеток, их жизнеспособность и/или титр продукта во время данной фазы.

"Перфузионная" среда для культивирования клеток или питательная среда относится к среде для культивирования клеток, которая, как правило, используется в культурах клеток, которые поддерживаются за счет перфузии или способов непрерывного культивирования, и является в достаточной степени полной, чтобы поддерживать культуру клеток во время данного способа. Составы перфузионной среды для культивирования клеток могут быть богаче или более концентрированными, чем составы базовых сред для культивирования клеток, чтобы соответствовать способу, используемому для удаления истощенной среды. Перфузионную среду для культивирования клеток можно применять как в фазе роста, так и в фазе продукции.

Термин "0,5× объем" означает приблизительно 50% объема. Термин "0,6× объем" означает приблизительно 60% объема. Аналогичным образом, 0,7×, 0,8×, 0,9× и 1,0× означают приблизительно 70%, 80%, 90% или 100% объема соответственно.

Термин "культивирование" или "культивирование клеток" означает поддержание или пролиферацию клетки млекопитающего при контролируемом наборе физических условий.

Термин "культура клеток млекопитающих" означает жидкую среду для культивирования, содержащую несколько клеток млекопитающих, которые поддерживаются или размножаются при контролируемом наборе физических условий.

Термин "жидкая среда для культивирования" означает жидкость, которая содержит достаточное количество питательных веществ, чтобы позволить клетке (например, клетке млекопитающего) расти или размножаться *in vitro*. Например, жидкая среда для культивирования может содержать одно или несколько из: аминокислот (например, 20 аминокислот), пурина (например, гипоксантина), пиримидина (например, тимидина), холина, инозита, тиамина, фолиевой кислоты, биотина, кальция, ниацинамида, пиридоксина, рибофлавина, тимидина, цианокобаламина, пирувата, липоевой кислоты, магния, глюкозы, натрия, калия, железа, меди, цинка и бикарбоната натрия. В некоторых вариантах осуществления жидкая среда для культивирования может содержать сыворотку крови от млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления жидкая среда для культивирования не содержит сыворотку крови или другой экстракт из млекопитающего (жидкая среда для культивирования с определенным составом). В некоторых вариантах осуществления жидкая среда для культивирования может содержать следовые количества металлов, гормон роста млекопитающих и/или фактор роста млекопитающих. Другим примером жидкой среды для культивирования является минимальная среда (например, среда, содержащая только неорганические соли, источник углерода и воду). Неограничивающие примеры жидкой среды для культивирования описаны в данном документе. Дополнительные примеры жидкой среды для культивирования известны из уровня техники и являются коммерчески доступными. Жидкая среда для культивирования может содержать клетки млекопитающих при любой плотности. Например, используемый в данном документе объем жидкой среды для культивирования, извлекаемый из биореактора, может практически не содержать клеток млекопитающих.

В контексте настоящего изобретения "биореактор" относится к сосуду, подходящему для проведения перфузионного культивирования клеток, в котором происходят по меньшей мере стадии (i) - (iii) по настоящему изобретению. Биореактором может быть одноразовый контейнер, например, изготовленный из пластика, или многоразовый контейнер, например, изготовленный из нержавеющей стали.

Термин "встряхивание" означает перемешивание или иное перемещение части жидкой среды для культивирования в биореакторе. Например, это проводится для того, чтобы увеличить концентрацию растворенного O₂ в жидкой среде для культивирования в биореакторе. Встряхивание можно проводить с применением любого способа, известного из уровня техники, например, с помощью прибора или мешалки. Иллюстративные примеры устройств и способов, которые можно применять для проведения встряхивания части жидкой среды для культивирования в биореакторе, известны из уровня техники.

Термин "непрерывный способ" означает способ, при котором жидкость непрерывно подается через по меньшей мере часть системы. Например, в любой из иллюстративных систем для непрерывного биологического производства жидкая среда для

культивирования, содержащая рекомбинантный терапевтический белок, непрерывно подается в систему, пока она находится в стадии эксплуатации, и субстанция лекарственного средства на основе терапевтического белка выводится из системы.

Термин "биореактор для периодического культивирования с подпиткой" представляет собой термин, известный в данной области, и означает биореактор, содержащий несколько клеток (например, клеток млекопитающих) в первой жидкой среде для культивирования, где культивирование клеток, присутствующих в биореакторе, включает периодическое или непрерывное добавление второй жидкой среды для культивирования к первой жидкой среде для культивирования без существенного или значительного удаления первой жидкой среды для культивирования или второй жидкой среды для культивирования из культуры клеток. Вторая жидкая среда для культивирования может быть такой же, как первая жидкая среда для культивирования. В некоторых примерах периодической культуры с подпиткой вторая жидкая среда для культивирования представляет собой концентрированную форму первой жидкой среды для культивирования. В некоторых примерах периодической культуры с подпиткой вторую жидкую среду для культивирования добавляют в виде сухого порошка.

Термин "усечение" означает частичное расщепление экспрессированного белка, обычно путем протеолиза.

Термин "деградация" обычно означает распад более крупного объекта, такого как пептид или белок, на по меньшей мере два более мелких объекта, из которых один объект может быть значительно крупнее, чем другой объект или объекты.

Термин "дезамидирование" означает любую химическую реакцию, в которой амидная функциональная группа в боковой цепи аминокислоты, как правило, аспарагина или глутамина, удаляется или превращается в другую функциональную группу. Как правило, аспарегин превращается в аспарагиновую кислоту или изоаспарагиновую кислоту.

Термин "агрегация" обычно относится к прямому взаимному притяжению между молекулами, например, с помощью сил Ван-дер-Ваальса или образования химической связи. В частности, под агрегацией понимается накопление и слипание белков друг с другом. Агрегаты могут включать аморфные агрегаты, олигомеры и амилоидные фибриллы и, как правило, называются высокомолекулярными (HMW) разновидностями, т. е. молекулами с более высокой молекулярной массой, чем молекулы чистого продукта, которые представляют собой неагрегированные молекулы, обычно называемые в данном документе также низкомолекулярными (LMW) разновидностями или мономером.

Как правило, кислотные разновидности понимаются в данном документе как входящие в состав вариантов, которые обычно наблюдают при анализе антител с помощью методик разделения на основе заряда, таких как гель-электрофорез с изоэлектрическим фокусированием (IEF), гель-электрофорез с капиллярным изоэлектрическим фокусированием (сIEF), катионообменная хроматография (CEX) и анионообменная хроматография (AEX). Эти варианты называются кислотными или основными разновидностями по сравнению с главными разновидностями. Как правило, кислотные

разновидности представляют собой варианты с более низкой кажущейся rI , а основные разновидности представляют собой варианты с более высокой кажущейся rI при анализе антител с использованием способов на основе IEF.

Как правило, термин "время пребывания" относится ко времени, в течение которого конкретная молекула продукта присутствует в биореакторе, т. е. времени от момента ее биотехнологического образования до ее выделения из просвета биореактора.

Как правило, "качество продукта" оценивают по наличию или отсутствию усечения, деградации, дезамидирования и/или агрегации. Например, продукт (молекула) с процентным содержанием HMW-разновидностей ниже 40%, предпочтительно ниже 35 или даже 30, 25 или 20%, может считаться продуктом предпочтительного качества. Также предпочтительное качество продукта ассоциировано с фактическим отсутствием остаточного белка клетки-хозяина (HCP) и фактическим отсутствием усечения, деградации и дезамидирования или со значительным снижением концентрации HCP, усечения, деградации и/или дезамидирования по сравнению с продуктом, произведенным посредством способа, отличного от способа по настоящему изобретению, как, например, посредством способа периодического культивирования с подпиткой. В контексте настоящего изобретения известные из уровня техники способы оценки качества продукта включают катионообменную высокоэффективную хроматографию для анализа заряженных вариантов (CEX-HPLC), триптическое пептидное картирование для выявления химических модификаций, ELISA для выявления белка клетки-хозяина (HCP), капиллярный электрофорез на геле с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях (RCE-SDS) и эксклюзионную высокоэффективную жидкостную хроматографию (SE-HPLC).

Термин "продукт на основе антител" относится к "секретируемому белку" или "секретируемому рекомбинантному белку" и означает белок (например, рекомбинантный белок), который первоначально содержал по меньшей мере одну сигнальную последовательность секреции при его трансляции в клетке млекопитающего, и за счет, по меньшей мере частично, ферментативного отщепления сигнальной последовательности секреции в клетке млекопитающего он секретируется, по меньшей мере частично, во внеклеточное пространство (например, жидкую среду для культивирования). Квалифицированные практики будут понимать, что "секретируемый" белок не должен полностью отделяться от клетки, чтобы считаться секретируемым белком.

Термин "продукт на основе биспецифического антитела" охватывает биспецифические антитела, такие как полноразмерные, например, антитела на основе IgG, а также их фрагменты, которые обычно называются в данном документе конструкциями на основе биспецифических антител.

Термин "конструкция на основе антитела" относится к молекуле, структура и/или функция которой основана/основаны на структуре и/или функции антитела, например, молекуле полноразмерного или целого иммуноглобулина, и/или получена/получены из доменов переменного участка тяжелой цепи (VH) и/или переменного участка легкой

цепи (VL) антитела или его фрагмента. Следовательно, конструкция на основе антитела способна связываться со своей специфической мишенью или антигеном. Кроме того, домен, который связывается со своим партнером по связыванию в соответствии с настоящим изобретением, понимается в данном документе как связывающий домен конструкции на основе антитела в соответствии с настоящим изобретением. Как правило, связывающий домен в соответствии с настоящим изобретением предусматривает минимальные структурные требования к антителу, которые обеспечивают связывание мишени. Данное минимальное требование, например, может определяться как присутствие по меньшей мере трех CDR легкой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и CDR3 VL-участка) и/или трех CDR тяжелой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и CDR3 VH-участка), предпочтительно всех шести CDR. Альтернативным подходом для определения минимальных структурных требований к антителу является определение эпитопа антитела в пределах структуры специфической мишени, белкового домена белка-мишени, образующего участок эпитопа (кластер эпитопа), или путем указания специфического антитела, конкурирующего за эпитоп определенного антитела, соответственно. Антитела, на которых основаны конструкции в соответствии с настоящим изобретением, включают, например, моноклональные, рекомбинантные, химерные, деиммунизированные, гуманизированные и человеческие антитела.

Например, связывающий домен конструкции на основе антитела в соответствии с настоящим изобретением может содержать вышеуказанные группы CDR. Предпочтительно данные CDR содержатся в каркасной области варибельного участка легкой цепи (VL) антитела и варибельного участка тяжелой цепи (VH) антитела; однако оно необязательно должно содержать оба участка. Fd-фрагменты, например, имеют два VH-участка и часто сохраняют в некоторой мере антигенсвязывающую функцию интактного антигенсвязывающего домена. Дополнительные примеры формата фрагментов антител, вариантов антител или связывающих доменов включают (1) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент с доменами VL, VH, CL и CH1; (2) F(ab')₂-фрагмент, бивалентный фрагмент с двумя Fab-фрагментами, соединенными дисульфидным мостиком в шарнирном участке; (3) Fd-фрагмент с двумя доменами VH и CH1; (4) Fv-фрагмент с доменами VL и VH из одного плеча антитела, (5) dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), который имеет домен VH; (6) выделенный участок, определяющий комплементарность (CDR), и (7) одноцепочечный Fv (scFv), причем последний является предпочтительным (например, получен из библиотеки scFv). Примеры вариантов осуществления конструкций на основе антител в соответствии с настоящим изобретением описаны, например, в WO 00/006605, WO 2005/040220, WO 2008/119567, WO 2010/037838, WO 2013/026837, WO 2013/026833, US 2014/0308285, US 2014/0302037, WO 2014/144722, WO 2014/151910 и WO 2015/048272.

Также в определения "связывающий домен" или "домен, который связывает" попадают фрагменты полноразмерных антител, такие как VH, VHH, VL, (s)dAb, Fv, Fd, Fab, Fab', F(ab')₂ или "r IgG" ("полуантитело"). Конструкции на основе антител в соответствии с настоящим изобретением могут также содержать модифицированные фрагменты антител,

также называемые вариантами антител, такие как scFv, ди-scFv или би(с)-scFv, scFv-Fc, scFv-застежка, scFab, Fab₂, Fab₃, диатела, одноцепочечные диатела, tandemные диатела (Tandab), tandemные ди-scFv, tandemные три-scFv, "мультитела", такие как триатела или тетратела, и однодоменные антитела, такие как нанотела или антитела из единственного вариабельного домена, содержащие только один вариабельный домен, который может представлять собой VHH, VH или VL, которые специфически связывают антиген или эпитоп независимо от других V-участков или доменов.

Используемые в данном документе термины "одноцепочечный Fv", "одноцепочечные антитела" или "scFv" относятся к состоящим из одной полипептидной цепи фрагментам антител, которые содержат вариабельные участки как из тяжелой, так и из легкой цепей, но в которых отсутствуют константные участки. Обычно одноцепочечное антитело дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет ему образовать требуемую структуру, которая будет обеспечивать возможность связывания антигена. Одноцепочечные антитела подробно обсуждаются Pluckthun в *Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). Известны различные способы создания одноцепочечных антител, включая описанные в патентах США №№ 4694778 и 5260203; в публикации международной заявки на патент № WO 88/01649; Bird (1988) *Science* 242:423-442; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; Ward *et al.* (1989) *Nature* 334:54454; Skerra *et al.* (1988) *Science* 242:1038-1041. В конкретных вариантах осуществления одноцепочечные антитела также могут быть биспецифическими, мультиспецифическими, человеческими и/или гуманизированными и/или синтетическими.

Кроме того, определение термина "конструкция на основе антитела" включает моновалентные, бивалентные и поливалентные/мультивалентные конструкции и, следовательно, биспецифические конструкции, специфически связывающиеся только с двумя антигенными структурами, а также полиспецифические/мультиспецифические конструкции, которые специфически связывают более двух антигенных структур, например, три, четыре или более, за счет отдельных связывающих доменов. Более того, определение термина "конструкция на основе антитела" включает молекулы, состоящие только из одной полипептидной цепи, а также молекулы состоящие из более чем одной полипептидной цепи, при этом цепи могут быть либо идентичными (гомодимеры, гомотримеры или гомоолигомеры), либо разными (гетеродимер, гетеротример или гетероолигомер). Примеры для определенных выше антител и их вариантов или производных описаны, помимо прочего, в Harlow and Lane, *Antibodies a laboratory manual*, CSHL Press (1988), и Using *Antibodies: a laboratory manual*, CSHL Press (1999), Kontermann and Dübel, *Antibody Engineering*, Springer, 2nd ed. 2010, и Little, *Recombinant Antibodies for Immunotherapy*, Cambridge University Press 2009.

Применяемый в данном документе термин "биспецифический" относится к конструкции на основе антитела, которая является "по меньшей мере биспецифической", т. е. она содержит по меньшей мере первый связывающий домен и второй связывающий

домен, где первый связывающий домен связывается с одним антигеном или мишенью (например, поверхностным антигеном клетки-мишени), а второй связывающий домен связывается с другим антигеном или мишенью (например, CD3). Соответственно, конструкции на основе антител в соответствии с настоящим изобретением характеризуются специфичностью в отношении по меньшей мере двух разных антигенов или мишеней. Например, первый домен предпочтительно не связывается с внеклеточным эпитопом CD3ε одного или нескольких видов, описанных в данном документе. Термин "поверхностный антиген клетки-мишени" относится к антигенной структуре, которая экспрессируется клеткой и которая присутствует на клеточной поверхности, так что она является доступной для конструкции на основе антитела, описанной в данном документе. Он может представлять собой белок, предпочтительно внеклеточную часть белка, или углеводную структуру, предпочтительно углеводную структуру белка, такого как гликопротеин. Предпочтительно он представляет собой опухолевый антиген. Термин "конструкция на основе биспецифического антитела" по настоящему изобретению также охватывает конструкции на основе мультиспецифических антител, такие как конструкции на основе триспецифических антител, причем последние включают три связывающих домена, или конструкции с более чем тремя (например, четырьмя, пятью...) видами специфичности.

С учетом того, что конструкции на основе антител в соответствии с настоящим изобретением являются (по меньшей мере) биспецифическими, они не встречаются в природе и они сильно отличаются от продуктов природного происхождения. Следовательно, конструкция на основе "биспецифического" антитела или иммуноглобулина представляет собой искусственное гибридное антитело или иммуноглобулин, имеющие по меньшей мере два отдельных связывающих участка с разными специфичностями. Конструкции на основе биспецифических антител можно получать с помощью разных способов, включая слияние гибридом или связывание Fab'-фрагментов. См., например, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990).

По меньшей мере два связывающих домена и переменные домены (VH/VL) конструкции на основе антитела по настоящему изобретению могут содержать или не содержать пептидные линкеры (спейсерные пептиды). Термин "пептидный линкер" в соответствии с настоящим изобретением включает аминокислотную последовательность, с помощью которой аминокислотные последовательности одного (переменного и/или связывающего) домена и другого (переменного и/или связывающего) домена конструкции на основе антитела по настоящему изобретению соединены друг с другом. Пептидные линкеры также можно использовать для слияния третьего домена с другими доменами конструкции на основе антитела по настоящему изобретению. Важной технической особенностью такого пептидного линкера является то, что у него отсутствует какая-либо полимеризационная активность. К подходящим пептидным линкерам относятся описанные в патентах США 4751180 и 4935233 или WO 88/09344. Пептидные линкеры также можно использовать для присоединения других доменов, или модулей, или участков (таких как увеличивающие период полувыведения домены) к конструкции на основе

антитела по настоящему изобретению.

Конструкции на основе антител по настоящему изобретению предпочтительно представляют собой "конструкции на основе антител, полученные *in vitro*". Этот термин относится к конструкции на основе антитела в соответствии с определением выше, где весь переменный участок или его часть (например, по меньшей мере один CDR) получен в ходе отбора на неиммунных клетках, например, с помощью фогового дисплея *in vitro*, белкового чипа или любого другого способа, в котором последовательности-кандидаты можно тестировать в отношении их способности к связыванию с антигеном. Предпочтительно этот термин исключает последовательности, созданные исключительно путем реаранжировок в геноме иммунной клетки животного. "Рекомбинантное антитело" представляет собой антитело, полученное с использованием технологии рекомбинантной ДНК или генной инженерии.

Термин "моноклональное антитело" (mAb) или конструкция на основе моноклонального антитела, применяемый в данном документе, относится к антителу, полученному из популяции практически однородных антител, т. е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными за исключением возможных встречающихся в природе мутаций и/или посттрансляционных модификаций (например, изомеризаций, амидирований), которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими, будучи направленными против одного антигенного участка или одной детерминанты на антигене, в противоположность препаратам традиционных (поликлональных) антител, которые, как правило, содержат разные антитела, направленные против разных детерминант (или эпитопов). В дополнение к их специфичности моноклональные антитела имеют преимущество в том, что они синтезируются в культуре гибридомы, следовательно, не загрязнены другими иммуноглобулинами. Определение "моноклональное" указывает на природу антитела как полученного из практически однородной популяции антител, и его не следует толковать как требование получения антитела с помощью какого-либо конкретного способа.

Для получения моноклональных антител можно применять любую методику, обеспечивающую получение антител с помощью непрерывных культур линий клеток. Например, моноклональные антитела, подлежащие применению, можно получать с помощью гибридного способа, впервые описанного в Koehler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975), или можно получать с помощью способов рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4816567). Примеры дополнительных методик получения человеческих моноклональных антител включают методику триомы, методику человеческой В-клеточной гибридомы (Kozbor, Immunology Today 4 (1983), 72) и методику EBV-гибридомы (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96).

Затем гибридомы можно подвергать скринингу с применением стандартных способов, таких как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) и анализ на основе поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore™), для идентификации одной или

нескольких гибридом, продуцирующих антитело, специфически связывающееся с указанным антигеном. В качестве иммуногена можно применять любую форму релевантного антигена, например, рекомбинантный антиген, встречающиеся в природе формы, его любые варианты или фрагменты, а также его антигенный пептид. Поверхностный плазмонный резонанс, используемый в системе BIAcore, можно применять для повышения эффективности фаговых антител, связывающихся с эпитопом поверхностного антигена клетки-мишени, (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmborg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13).

Другой иллюстративный способ получения моноклональных антител включает скрининг библиотек экспрессируемых белков, например, библиотек фагового дисплея или рибосомного дисплея. Фаговый дисплей описан, например, в Ladner *et al.*, патенте США № 5223409; Smith (1985) Science 228:1315-1317, Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991) и Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991).

В дополнение к применению дисплейных библиотек релевантный антиген можно применять для иммунизации животного, отличного от человека, например, грызуна (такого как мышь, хомяк, кролик или крыса). В одном варианте осуществления животное, отличное от человека, содержит по меньшей мере часть гена иммуноглобулина человека. Например, можно создавать линии мышей с дефицитом продуцирования мышинных антител, имеющих крупные фрагменты локусов генов Ig (иммуноглобулина) человека. Используя гибридную технологию, можно получать и отбирать антиген-специфические моноклональные антитела, полученные за счет генов с требуемой специфичностью. См., например, XENOMOUSE™, Green *et al.* (1994) Nature Genetics 7:13-21, US 2003-0070185, WO 96/34096 и WO 96/33735.

Моноклональное антитело также можно получить от животного, отличного от человека, а затем его можно модифицировать, например, гуманизировать, деиммунизировать, получить химеру, с применением методик рекомбинантной ДНК, известных из уровня техники. Примеры конструкций на основе модифицированных антител включают гуманизированные варианты не являющихся человеческими антител, антитела, "подвергнутые созреванию аффинности" (см., например, Hawkins *et al.* J. Mol. Biol. 254, 889-896 (1992) и Lowman *et al.*, Biochemistry 30, 10832- 10837 (1991)), и мутантные антитела с измененной эффекторной функцией(-ями) (см., например, патент США 5648260, Kontermann and Dübel (2010), *loc. cit.* и Little (2009), *loc. cit.*).

В иммунологии созревание аффинности представляет собой процесс, при котором В-клетки продуцируют антитела с повышенной аффинностью к антигену по мере протекания иммунного ответа. При повторных воздействиях того же антигена организм хозяина будет продуцировать антитела с постепенно возрастающей аффинностью. Аналогично природному прототипу созревание аффинности *in vitro* основано на принципах мутации и селекции. Созревание аффинности *in vitro* с успехом было применено для оптимизации антител, конструкций на основе антител и фрагментов антител. Случайные мутации внутри CDR вводятся с применением ионизирующего излучения, химических

мутагенов или ПЦР с внесением ошибок. Кроме того, генетическое разнообразие может быть увеличено за счет шаффлинга цепей. Два или три цикла введения мутаций и отбора с применением таких дисплейных методик, как фаговый дисплей, обычно приводят к фрагментам антител с аффинностями в диапазоне низких наномолярных значений.

Предпочтительный тип варианта конструкций на основе антител с заменами аминокислот включает замену одного или более остатков гипервариабельного участка исходного антитела (например, гуманизированного или человеческого антитела). Как правило, полученный вариант(-ы), отобранный для дальнейшей разработки, будет иметь улучшенные биологические свойства по сравнению с исходным антителом, из которого он получен. Удобный способ создания таких вариантов с заменами включает созревание аффинности с применением фагового дисплея. Вкратце, несколько сайтов гипервариабельного участка (например, 6-7 сайтов) подвергаются мутации с получением всех возможных аминокислотных замен в каждом сайте. Полученные таким образом варианты антител подвергаются дисплею в моновалентном виде на частицах нитевидного фага в качестве слияний с продуктом гена *III M13*, упакованных в каждой частице. Затем фаг-дисплейные варианты подвергаются скринингу в отношении их биологической активности (например, аффинности связывания), как раскрыто в данном документе. Чтобы идентифицировать сайты гипервариабельного участка, являющиеся кандидатами для проведения модификаций, можно проводить аланин-сканирующий мутагенез для идентификации остатков гипервариабельного участка, которые вносят существенный вклад в связывание антигена. В качестве альтернативы или дополнительно, целесообразным может быть проведение анализа кристаллической структуры комплекса антиген-антитело для идентификации точек контакта между связывающим доменом и, например, поверхностным антигеном клетки-мишени человека. Такие контактирующие остатки и соседние остатки являются кандидатами для замены в соответствии с методиками, разработанными в данном документе. После создания таких вариантов панель вариантов подвергается скринингу, описанному в данном документе, и антитела с лучшими свойствами в одном или нескольких релевантных анализах можно отбирать для дальнейшей разработки.

Моноклональные антитела и конструкции на основе антител по настоящему изобретению, в частности, включают "химерные" антитела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из конкретного биологического вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, тогда как остальная часть цепи(-ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из другого биологического вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител при условии, что они проявляют требуемую биологическую активность (патент США № 4816567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). В данном документе представляющие интерес химерные антитела включают "приматизированные" антитела, содержащие

антигенсвязывающие последовательности переменных доменов, полученные от отличного от человека примата (например, мартышковой обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п.), и последовательности константных участков человека. Были описаны разнообразные подходы к получению химерных антител. См. например, Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 81:6851, 1985; Takeda *et al.*, Nature 314:452, 1985, Cabilly *et al.*, патент США № 4816567; Boss *et al.*, патент США № 4816397; Tanaguchi *et al.*, EP 0171496; EP 0173494 и GB 2177096.

Антитело, конструкция на основе антитела, фрагмент антитела или вариант антитела можно также модифицировать путем специфической делеции Т-клеточных эпитопов человека (способ, называемый "деиммунизацией") посредством способов, раскрытых, например, в WO 98/52976 или WO 00/34317. Вкратце, переменные домены тяжелой и легкой цепи антитела можно проанализировать в отношении наличия пептидов, которые связываются с молекулами МНС класса II; эти пептиды представляют потенциальные Т-клеточные эпитопы (как определено в WO 98/52976 и WO 00/34317). Для обнаружения потенциальных Т-клеточных эпитопов можно применять подход компьютерного моделирования, называемый "протягиванием пептидов", и в дополнение можно осуществить поиск мотивов, присутствующих в последовательностях VH и VL, в базе данных пептидов, связывающихся с молекулами МНС класса II человека, как описано в WO 98/52976 и WO 00/34317. Эти мотивы связываются с любым из 18 основных DR-аллотипов молекул МНС класса II и, таким образом, представляют собой потенциальные Т-клеточные эпитопы. Обнаруженные потенциальные Т-клеточные эпитопы можно устранить посредством замены небольшого числа аминокислотных остатков в переменных доменах или предпочтительно посредством замен одиночных аминокислот. Обычно производят консервативные замены. Часто, но не исключительно, может использоваться аминокислота, обычно присутствующая в данном положении в последовательностях антител зародышевой линии человека. Последовательности зародышевой линии человека раскрыты, например, в Tomlinson, *et al.* (1992) J. Mol. Biol. 227:776-798; Cook, G.P. *et al.* (1995) Immunol. Today Vol. 16 (5): 237-242; и Tomlinson *et al.* (1995) EMBO J. 14: 14:4628-4638. Каталог V BASE представляет собой обширный каталог последовательностей переменных участков иммуноглобулинов человека (составленный Tomlinson, L.A. *et al.* MRC Centre for Protein Engineering, Кембридж, Великобритания). Эти последовательности можно применять в качестве источника человеческих последовательностей, например, для каркасных участков и CDR. Также можно использовать консенсусные каркасные участки человека, например, описанные в патенте США № 6300064.

"Гуманизированные" антитела, конструкции на основе антител, их варианты или фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие последовательности антител) представляют собой антитела или иммуноглобулины из преимущественно человеческих последовательностей, которые содержат минимальную последовательность(-и), полученную из иммуноглобулина, не являющегося иммуноглобулином человека. Гуманизированные антитела по большей части представляют

собой иммуноглобулины человека (антитело-реципиент), в которых остатки из гипервариабельного участка (также CDR) реципиента замещены на остатки из гипервариабельного участка (антитела-донора) от биологического вида, отличного от человека (например, грызуна), такого как мышь, крыса, хомяк или кролик, с требуемой специфичностью, аффинностью и способностью к связыванию. В некоторых случаях остатки каркасного участка (FR) из Fv иммуноглобулина человека замещают соответствующими остатками, не являющиеся человеческими. Кроме того, применяемые в данном документе "гуманизированные антитела" могут также содержать остатки, не встречающиеся ни в антителе-реципиенте, ни в антителе-доноре. Эти модификации производят для дополнительного улучшения и оптимизации характеристик антитела. Гуманизированное антитело также может содержать по меньшей мере часть константного участка иммуноглобулина (Fc), как правило, часть иммуноглобулина человека. Подробнее см. Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525 (1986); Reichmann *et al.*, Nature, 332: 323-329 (1988); и Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992).

Гуманизированные антитела или их фрагменты можно создавать путем замены последовательностей вариабельного домена Fv, не участвующих непосредственно в связывании антигена, эквивалентными последовательностями из вариабельных доменов Fv человека. Иллюстративные способы создания гуманизированных антител или их фрагментов представлены в Morrison (1985) Science 229:1202-1207; Oi *et al.* (1986) BioTechniques 4:214; и в US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 5859205 и US 6407213. Эти способы включают выделение последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих целые вариабельные домены Fv иммуноглобулина или их части, из по меньшей мере одной тяжелой или легкой цепи, манипуляции с ними и их экспрессию. Такие нуклеиновые кислоты можно получать из гибридомы, продуцирующей антитело к предварительно заданной мишени, описанной выше, а также из других источников. Рекомбинантную ДНК, кодирующую молекулу гуманизированного антитела, можно затем клонировать в подходящий вектор экспрессии.

Гуманизированные антитела также можно получать, используя трансгенных животных, таких как мыши, которые экспрессируют гены тяжелой и легкой цепей человека, но не способны экспрессировать эндогенные гены тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина мыши. Winter описывает иллюстративный способ пересадки CDR, который можно применять для получения гуманизированных антител, описанных в данном документе (патент США № 5225539). Все из CDR конкретного человеческого антитела могут быть по меньшей мере частично замещены на CDR из отличных от человеческих последовательностей, или только некоторые CDR могут быть замещены на CDR из отличных от человеческих последовательностей. Необходимо замещать только ряд CDR, требуемых для связывания гуманизированного антитела с предварительно заданным антигеном.

Гуманизированное антитело можно оптимизировать путем введения консервативных замен, замен консенсусными последовательностями, замен остатками из

последовательностей зародышевой линии и/или обратных мутаций. Такие измененные молекулы иммуноглобулинов можно получать с помощью любой из нескольких методик, известных из уровня техники (например, Teng *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 7308-7312, 1983; Kozbor *et al.*, Immunology Today, 4: 7279, 1983; Olsson *et al.*, Meth. Enzymol., 92: 3-16, 1982, и EP 239 400).

Термин "человеческое антитело", "конструкция на основе человеческого антитела" и "связывающий домен человека" включает антитела, конструкции на основе антител и связывающие домены, имеющие участки антител, такие как вариабельный и константный участки или домены, которые практически полностью соответствуют последовательностям иммуноглобулинов зародышевой линии человека, известных в данной области техники, включая, например, описанные в Kabat *et al.* (1991) (*loc. cit.*). Человеческие антитела, конструкции на основе антител или связывающие домены по настоящему изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, содержат мутации, введенные за счет случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или за счет соматических мутаций *in vivo*), например в CDR, и, в частности, в CDR3. Человеческие антитела, конструкции на основе антител или связывающие домены могут содержать по меньшей мере одно, два, три, четыре, пять или более положений, замещенных аминокислотным остатком, не кодируемым последовательностью иммуноглобулина зародышевой линии человека. Однако используемое в данном документе определение человеческих антител, конструкций на основе антител и связывающих доменов также предусматривает "полностью человеческие антитела", которые включают только последовательности человеческих антител, не являющиеся искусственными и/или генетически измененными, подобные тем, которые могут быть получены с применением методик или систем, таких как Xenomouse. Предпочтительно "полностью человеческое антитело" не содержит аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии.

В некоторых вариантах осуществления конструкции на основе антител по настоящему изобретению являются "выделенными" или "практически чистыми" конструкциями на основе антител. "Выделенный" или "практически чистый", применяемые для описания конструкций на основе антител, раскрытых в данном документе, означает конструкцию на основе антитела, которая была идентифицирована, отделена и/или восстановлена из компонента среды ее получения. Предпочтительно конструкция на основе антитела не связана или практически не связана со всеми остальными компонентами из среды ее получения. Загрязняющие компоненты из среды получения, такие как полученные из рекомбинантных трансфицированных клеток, представляют собой материалы, которые, как правило, будут мешать диагностическому или терапевтическому применению полипептида, и они могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. Например, конструкции на основе антител могут составлять по меньшей мере приблизительно 5% или по меньшей мере приблизительно 50% по весу от

общего белка в заданном образце. Понятно, что выделенный белок может составлять от 5% до 99,9% по весу от общего содержания белка в зависимости от обстоятельств. Полипептид можно получать при существенно большей концентрации благодаря применению индуцируемого промотора или промотора, обеспечивающего высокий уровень экспрессии, вследствие чего он продуцируется на уровнях с повышенной концентрацией. Данное определение включает получение конструкции на основе антитела в самых разнообразных организмах и/или клетках-хозяевах, которые известны в данной области техники. В предпочтительных вариантах осуществления конструкцию на основе антитела будут очищать (1) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности, используя секвенатор с вращающимся стаканом, или (2) до однородности согласно SDS-PAGE в невосстанавливающих или восстанавливающих условиях с применением окрашивания кумасси синим или предпочтительно серебром. Обычно, однако, выделенную конструкцию на основе антитела будут получать с помощью по меньшей мере одной стадии очистки.

Термин "связывающий домен" применительно к настоящему изобретению характеризует домен, который (специфически) связывается с/взаимодействует с/распознает указанный эпитоп-мишень или указанный сайт молекул-мишеней (антигенов), например, CD33 и CD3 соответственно. Структура и функция первого связывающего домена (распознающего, например, CD33) и предпочтительно также структура и/или функция второго связывающего домена (распознающего, например, CD3) основана/основаны на структуре и/или функции антитела, например, полноразмерной или целой молекулы иммуноглобулина, и/или он/они получен/получены из доменов переменного участка тяжелой цепи (VH) и/или переменного участка легкой цепи (VL) антитела или его фрагмента. Предпочтительно первый связывающий домен характеризуется наличием трех CDR легкой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и CDR3 VL-участка) и/или трех CDR тяжелой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и CDR3 VH-участка). Второй связывающий домен предпочтительно также предусматривает минимальные структурные требования к антителу, которые обеспечивают связывание мишени. Более предпочтительно второй связывающий домен содержит по меньшей мере три CDR легкой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и CDR3 VL-участка) и/или три CDR тяжелой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и CDR3 VH-участка). Подразумевается, что первый и/или второй связывающий домен получены или их можно получать с помощью способов фагового дисплея или скрининга библиотек, а не путем пересадки последовательностей CDR из уже существующего (моноклонального) антитела в каркас.

В соответствии с настоящим изобретением связывающие домены находятся в виде одного или нескольких полипептидов. Такие полипептиды могут содержать белковые части и небелковые части (например, химические линкеры или химические перекрестносшивающие средства, такие как глутаральдегид). Белки (в том числе их фрагменты, предпочтительно биологически активные фрагменты, и пептиды, обычно имеющие менее 30 аминокислот) содержат две или более аминокислот, соединенных друг с другом ковалентной пептидной связью (с образованием цепи из аминокислот).

Термин "полипептид", применяемый в данном документе, описывает группу молекул, содержащих обычно более 30 аминокислот. Полипептиды могут дополнительно образовывать мультимеры, такие как димеры, тримеры и высшие олигомеры, т. е. состоящие из более чем одной полипептидной молекулы. Полипептидные молекулы, образующие такие димеры, тримеры и т. п., могут быть идентичными или неидентичными. Соответствующие структуры высшего порядка таких мультимеров, следовательно, называются гомо- или гетеродимерами, гомо- или гетеротримерами и т. п. Примером гетеромультимера является молекула антитела, которая в своей встречающейся в природе форме состоит из двух идентичных полипептидных легких цепей и двух идентичных полипептидных тяжелых цепей. Термины "пептид", "полипептид" и "белок" также относятся к модифицированным естественным образом пептидам/полипептидам/белкам, где модификация осуществляется посредством, например, посттрансляционных модификаций, таких как гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование и т. п. "Пептид", "полипептид" или "белок", упоминаемый в данном документе, может быть также модифицирован химическим путем, как например, посредством пегилирования. Такие модификации хорошо известны из уровня техники и описаны ниже в данном документе.

Предпочтительно связывающий домен, который связывается с поверхностным антигеном клетки-мишени, и/или связывающий домен, который связывается с CD3ε, является/являются связывающим(-и) доменом(-ами) человека. Антитела и конструкции на основе антител, содержащие по меньшей мере один связывающий домен человека, позволяют избежать ряда проблем, ассоциированных с антителами или конструкциями на основе антител, которые имеют переменные и/или константные участки, не относящиеся к человеческим, такие как участки от грызунов (например, мыши, крысы, хомяка или кролика). Присутствие таких белков, полученных из грызунов, может приводить к быстрому выведению антител или конструкций на основе антител или может приводить к выработке иммунного ответа на антитело или конструкцию на основе антитела у пациента. Чтобы избежать применения полученных от грызунов антител или конструкций на основе антител, можно создавать человеческие или полностью человеческие антитела/конструкции на основе антител путем введения в грызуна функциональных участков человеческого антитела так, чтобы у грызуна продуцировались полностью человеческие антитела.

Возможность клонировать и воссоздавать локусы человека размером порядка миллиона пар оснований в YAC и вводить их в мышиную зародышевую линию обеспечивает эффективный подход для изучения функциональных компонентов очень крупных или грубо картированных локусов, а также для создания полезных моделей заболеваний человека. Кроме того, применение такой технологии для замены мышинных локусов их человеческими эквивалентами может обеспечить уникальную информацию об экспрессии и регуляции генных продуктов человека во время развития, их взаимодействии с другими системами и их роли в индуцировании и прогрессировании заболеваний.

Важным практическим применением такой стратегии является "гуманизация"

гуморальной иммунной системы мыши. Введение локусов иммуноглобулина (Ig) человека в мышей, у которых были инактивированы эндогенные гены Ig, предоставляет возможность изучения механизмов, лежащих в основе программируемой экспрессии и сборки антител, а также их роли в развитии В-клеток. Кроме того, такая стратегия может обеспечить идеальный источник для получения полностью человеческих моноклональных антител (mAb) - ключевой точки на пути к созданию терапевтических средств на основе антител для лечения заболеваний человека. Ожидается, что полностью человеческие антитела или конструкции на основе антител сведут к минимуму иммуногенные и аллергические ответы, присущие мышинным или полученным от мышей mAb, и, следовательно, повысят эффективность и безопасность вводимых антител/конструкций на основе антител. Можно ожидать, что применение полностью человеческих антител или конструкций на основе антител обеспечит существенное преимущество в лечении хронических и рецидивирующих заболеваний человека, таких как воспаление, аутоиммунные реакции и рак, при которых требуются повторные введения соединений.

Один подход в направлении этой цели состоял в конструировании мышинных линий с дефицитом продуцирования мышинных антител, содержащих большие фрагменты локусов Ig человека, в ожидании, что такие мыши будут вырабатывать большой репертуар человеческих антител в отсутствие мышинных антител. Большие фрагменты Ig человека сохраняли бы широкое разнообразие генов вариабельных участков, а также надлежащую регуляцию продуцирования и экспрессии антител. За счет использования мышинового аппарата синтеза для расширения разнообразия и отбора антител и отсутствия иммунологической толерантности к человеческим белкам воспроизведенный репертуар человеческих антител в этих линиях мышей должен привести к получению высокоаффинных антител к любому представляющему интерес антигену, включая человеческие антигены. Используя гибридную технологию, можно легко получать и проводить отбор антиген-специфических человеческих mAb с требуемой специфичностью. Эта общая стратегия была продемонстрирована в сочетании с созданием первых линий мышей XenoMouse (см. Green et al. *Nature Genetics* 7:13-21 (1994)). Были сконструированы линии XenoMouse с дрожжевыми искусственными хромосомами (YAC), содержащими фрагменты размером 245 т. п. и 190 т. п. человеческого локуса тяжелой цепи и локуса легкой каппа-цепи в конфигурации зародышевой линии соответственно, которые содержали коровые последовательности вариабельного и константного участков. YAC, содержащие Ig человека, оказались совместимыми с мышиной системой с точки зрения как реаранжировки, так и экспрессии антител, и были способны заменить инактивированные гены Ig мыши. Это продемонстрировало их способностью индуцировать развитие В-клеток, продуцировать человеческий репертуар полностью человеческих антител взрослого типа и давать антиген-специфические человеческие mAb. Эти результаты также позволяют предположить, что введение более крупных частей локусов Ig человека, содержащих большее количество V-генов, дополнительных регуляторных элементов и константных участков Ig человека, могло бы практически полностью воспроизвести полный репертуар,

который характерен для гуморального ответа человека на инфекцию и иммунизацию. Работа Green et al. была недавно расширена до введения более чем приблизительно 80% репертуара человеческих антител благодаря введению фрагментов YAC размером порядка миллиона пар оснований человеческого локуса тяжелой цепи и локуса легкой каппа-цепи в конфигурации зародышевой линии соответственно. См. Mendez *et al.* Nature Genetics 15:146-156 (1997) и заявку на патент США с порядковым № 08/759620.

Получение мышей XenoMouse дополнительно обсуждается и описывается в заявках на патент США с порядковым № 07/466008, порядковым № 07/610515, порядковым № 07/919297, порядковым № 07/922649, порядковым № 08/031801, порядковым № 08/112848, порядковым № 08/234145, порядковым № 08/376279, порядковым № 08/430938, порядковым № 08/464584, порядковым № 08/464582, порядковым № 08/463191, порядковым № 08/462837, порядковым № 08/486853, порядковым № 08/486857, порядковым № 08/486859, порядковым № 08/462513, порядковым № 08/724752 и порядковым № 08/759620; и патентах США № 6162963; 6150584; 6114598; 6075181 и 5939598, и патентах Японии № 3 068 180 B2, 3068506 B2 и 3068507 B2. См. также Mendez *et al.* Nature Genetics 15:146-156 (1997) и Green and Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495 (1998), EP 0 463 151 B1, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 98/24893, WO 00/76310 и WO 03/47336.

В альтернативном подходе другие разработчики, в том числе GenPharm International, Inc., использовали подход "минилокуса". В подходе минилокуса локус экзогенного Ig имитируют путем включения частей (отдельных генов) из локуса Ig. Таким образом, один или несколько генов VH, один или несколько генов DH, один или несколько генов JH, константный участок мю-цепи и второй константный участок (предпочтительно константный участок гамма-цепи) собирают в конструкцию, предназначенную для введения в животное. Этот подход описан в патенте США № 5545807 под авторством Surani *et al.* и патентах США №№ 5545806; 5625825; 5625126; 5633425; 5661016; 5770429; 5789650; 5814318; 5877397; 5874299 и 6255458, каждый под авторством Lonberg и Kay, патентах США № 5591669 и 6023010 под авторством Krimpenfort и Berns, патентах США №№ 5612205; 5721367 и 5789215 под авторством Berns *et al.* и патенте США № 5643763 под авторством Choi и Dunn, и заявке на патент США от GenPharm International с порядковым № 07/574748, порядковым № 07/575962, порядковым № 07/810279, порядковым № 07/853408, порядковым № 07/904068, порядковым № 07/990860, порядковым № 08/053131, порядковым № 08/096762, порядковым № 08/155301, порядковым № 08/161739, порядковым № 08/165699, порядковым № 08/209741. См. также EP 0546073 B1, WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 и WO 98/24884 и патент США № 5981175. См. дополнительно Taylor *et al.* (1992), Chen *et al.* (1993), Tuailon *et al.* (1993), Choi *et al.* (1993), Lonberg *et al.* (1994), Taylor *et al.* (1994) и Tuailon *et al.* (1995), Fishwild *et al.* (1996).

Kirin также продемонстрировал создание человеческих антител с использованием

мышей, в которых были введены крупные части хромосом или целые хромосомы посредством слияния с микрочетками. См. заявки на Европейский патент №№ 773288 и 843961. Xenex Biosciences разрабатывают технологию для потенциального создания человеческих антител. В этой технологии мышей SCID восстанавливают с помощью лимфатических клеток человека, например, В- и/или Т-клеток. Затем мышей иммунизируют антигеном и у них может индуцироваться иммунный ответ на этот антиген. См. патенты США №№ 5476996; 5698767 и 5958765.

Выработка человеческих антител к мышинным антителам (НАМА) привели данную отрасль к созданию химерных или иным способом гуманизированных антител. Однако ожидается, что будет наблюдаться выработка определенных человеческих антител к химерным антителам (НАСА), в частности, при постоянном или многодозовом использовании такого антитела. Таким образом, будет требоваться обеспечение конструкций на основе антител, содержащих связывающий домен человека к поверхностному антигену клетки-мишени и связывающий домен человека к CD3ε, чтобы свести к минимуму опасности и/или эффекты, связанные с выработкой НАМА или НАСА.

В соответствии с настоящим изобретением термины "(специфически) связывается с", "(специфически) распознает", "направлен (специфически) на" и "(специфически) вступает в реакцию с" означают, что связывающий домен взаимодействует или специфически взаимодействует с данным эпитопом или с данным сайтом-мишенью на молекулах-мишенях (антигенах), в данном случае с поверхностным антигеном клетки-мишени и CD3ε соответственно.

Термин "эпитоп" относится к сайту антигена, с которым специфически связывается связывающий домен, такой как антитело или иммуноглобулин или производное, фрагмент или вариант антитела или иммуноглобулина. "Эпитоп" является антигенным, и поэтому термин "эпитоп" иногда также называется в данном документе "антигенной структурой" или "антигенной детерминантой". Таким образом, связывающий домен представляет собой "сайт взаимодействия с антигеном". Указанное связывание/взаимодействие также понимают как определяющее "специфическое распознавание".

"Эпитопы" могут быть образованы как смежными аминокислотами, так и несмежными аминокислотами, размещаемыми рядом при укладке белка в третичную структуру. "Линейный эпитоп" представляет собой эпитоп, где первичная аминокислотная последовательность образует распознаваемый эпитоп. Как правило, линейный эпитоп содержит по меньшей мере 3 или по меньшей мере 4, и чаще по меньшей мере 5, или по меньшей мере 6, или по меньшей мере 7, например, от приблизительно 8 до приблизительно 10 аминокислот в уникальной последовательности.

"Конформационный эпитоп", в отличие от линейного эпитопа, представляет собой эпитоп, в котором первичная последовательность аминокислот, образующая эпитоп, не является единственным определяющим компонентом распознаваемого эпитопа (например, эпитоп, в котором первичная последовательность аминокислот не обязательно распознается связывающим доменом). Как правило, конформационный эпитоп содержит

большее количество аминокислот по сравнению с линейным эпитопом. Что касается распознавания конформационных эпитопов, связывающий домен распознает трехмерную структуру антигена, предпочтительно пептид или белок или его фрагмент (в контексте настоящего изобретения антигенная структура для одного из связывающих доменов содержится в пределах белка поверхностного антигена клетки-мишени). Например, когда молекула белка укладывается с образованием трехмерной структуры, определенные аминокислоты и/или полипептидный скелет, образующие конформационный эпитоп, оказываются размещенными рядом друг с другом, что позволяет антигену распознать эпитоп. Способы определения конформации эпитопов включают без ограничения рентгеновскую кристаллографию, двумерную спектроскопию ядерного магнитного резонанса (2D-ЯМР) и спектроскопию электронного парамагнитного резонанса (EPR) с сайт-направленным спин-мечением.

Способ картирования эпитопов описан следующим образом: когда участок (непрерывный аминокислотный сегмент) в белке поверхностного антигена клетки-мишени человека заменяют/замещают соответствующим участком поверхностного антигена клетки-мишени, не являющегося человеческим и не являющегося антигеном примата (например, поверхностным антигеном клетки-мишени мыши, но также возможны и другие антигены, такие как антигены курицы, крысы, хомяка, кролика и т. д.), ожидается снижение связывания связывающего домена, если только связывающий домен не является перекрестно-реактивным для поверхностного антигена клетки-мишени, не являющегося человеческим и не являющегося антигеном примата. Указанное снижение предпочтительно составляет по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40% или 50%; более предпочтительно по меньшей мере 60%, 70% или 80%, и наиболее предпочтительно 90%, 95% или даже 100% по сравнению со связыванием с соответствующим участком белка поверхностного антигена клетки-мишени человека, при этом связывание с соответствующим участком белка поверхностного антигена клетки-мишени человека принято за 100%. Предусматривается, что вышеупомянутые химеры поверхностного антигена клетки-мишени человека/поверхностного антигена клетки-мишени, не являющегося человеческим, экспрессируются в клетках СНО. Также предусматривается, что химеры поверхностного антигена клетки-мишени человека/поверхностного антигена клетки-мишени, не являющегося человеческим, слиты с трансмембранным доменом и/или цитоплазматическим доменом другого мембраносвязанного белка, такого как ЕpСAM.

В альтернативном или дополнительном способе картирования эпитопа можно создавать несколько усеченных вариантов внеклеточного домена поверхностного антигена клетки-мишени человека, чтобы определить специфический участок, который распознается связывающим доменом. В этих усеченных вариантах различные внеклеточные домены/субдомены или участки поверхностного антигена клетки-мишени поэтапно удаляют, начиная с N-конца. Предусматривается, что усеченные варианты поверхностного антигена клетки-мишени могут экспрессироваться в клетках СНО. Также предусматривается, что усеченные варианты поверхностного антигена клетки-мишени

могут быть слиты с трансмембранным доменом и/или цитоплазматическим доменом другого мембраносвязанного белка, такого как ЕpСАМ. Также предусматривается, что усеченные варианты поверхностного антигена клетки-мишени могут содержать сигнальный пептидный домен на своем N-конце, например сигнальный пептид, который получен из сигнального пептида тяжелой цепи IgG мыши. Более того, предусматривается, что усеченные варианты поверхностного антигена клетки-мишени могут содержать домен v5 на своем N-конце (после сигнального пептида), что позволяет подтвердить их правильную экспрессию на поверхности клетки. Ожидается, что снижение или потеря связывания будут происходить в случае тех усеченных вариантов поверхностного антигена клетки-мишени, которые больше не содержат участок поверхностного антигена клетки-мишени, который распознается связывающим доменом. Снижение связывания предпочтительно составляет по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%; более предпочтительно по меньшей мере 60%, 70%, 80% и наиболее предпочтительно 90%, 95% или даже 100%, где связывание с целым белком поверхностного антигена клетки-мишени человека (или его внеклеточным участком или доменом) принято за 100.

Дополнительный способ определения вклада конкретного остатка поверхностного антигена клетки-мишени в распознавание конструкцией на основе антитела или связывающим доменом представляет собой аланиновое сканирование (см., например, Morrison KL & Weiss GA. *Cur Opin Chem Biol.* 2001 Jun;5(3):302-7), где каждый анализируемый остаток заменяют аланином, например, посредством сайт-направленного мутагенеза. Применение аланина обусловлено наличием в нем небольшой, химически инертной метильной функциональной группы, которая, тем не менее, имитирует предпочтения к вторичной структуре, которыми обладают многие другие аминокислоты. В тех случаях, когда требуется сохранить размер остатков, подвергнутых мутации, иногда можно использовать крупные аминокислоты, такие как валин или лейцин. Аланиновое сканирование представляет собой проверенную технологию, которую используют уже длительное время.

Взаимодействие между связывающим доменом и эпитопом или участком, содержащим эпитоп, подразумевает, что связывающий домен проявляет значимую аффинность к эпитопу/участку, содержащему эпитоп, на конкретном белке или антигене (в данном случае: поверхностном антигене клетки-мишени и CD3 соответственно) и, как правило, не демонстрирует значительную реакционную способность с белками или антигенами, отличными от поверхностного антигена клетки-мишени или CD3. "Значимая аффинность" включает связывание с аффинностью, составляющей приблизительно 10^{-6} М (KD) или выше. Предпочтительно связывание считается специфическим, если аффинность связывания составляет приблизительно 10^{-12} - 10^{-8} М, 10^{-12} - 10^{-9} М, 10^{-12} - 10^{-10} М, 10^{-11} - 10^{-8} М, предпочтительно приблизительно 10^{-11} - 10^{-9} М. Специфичность реакции или связывания связывающего домена с мишенью можно легко проверить с помощью, среди прочего, сравнения реакции указанного связывающего домена с белком- или антигеном-мишенью и реакции указанного связывающего домена с белками или антигенами, отличными от

поверхностного антигена клетки-мишени или CD3. Предпочтительно связывающий домен по настоящему изобретению фактически или практически не связывается с белками или антигенами, отличными от поверхностного антигена клетки-мишени или CD3 (т. е. первый связывающий домен предпочтительно не способен к связыванию с белками, отличными от поверхностного антигена клетки-мишени, а второй связывающий домен не способен к связыванию с белками, отличными от CD3). Подразумеваемой характеристикой конструкций на основе антител в соответствии с данным изобретением является то, что они имеют превосходящие характеристики аффинности по сравнению с другими HLE-форматами. Следовательно, такая превосходящая аффинность предполагает удлиненный период полувыведения *in vivo*. Большой период полувыведения конструкций на основе антител в соответствии с настоящим изобретением может снизить длительность и частоту введения, что, как правило, вносит вклад в улучшение соблюдения пациентом режима лечения. Это является исключительно важным, поскольку конструкции антител по настоящему изобретению являются исключительно благоприятными для сильно ослабленных или даже полиморбидных пациентов с раком.

Термин "фактически/практически не связывается" или "не способен к связыванию" означает, что связывающий домен по настоящему изобретению не связывается с белком или антигеном, отличным от поверхностного антигена клетки-мишени или CD3, т. е. проявляет реакционную способность, составляющую не более 30%, предпочтительно не более 20%, более предпочтительно не более 10%, особенно предпочтительно не более 9%, 8%, 7%, 6% или 5% с белками или антигенами, отличными от поверхностного антигена клетки-мишени или CD3, при этом связывание с поверхностным антигеном клетки-мишени или CD3 соответственно принято за 100%.

Полагают, что специфическое связывание осуществляется благодаря специфическим мотивам в аминокислотной последовательности связывающего домена и антигена. Таким образом, связывание достигается за счет их первичной, вторичной и/или третичной структуры, а также за счет вторичных модификаций указанных структур. Специфическое взаимодействие сайта, взаимодействующего с антигеном, и его специфического антигена может приводить к простому связыванию указанного сайта с антигеном. Более того, в качестве альтернативы или дополнения специфическое взаимодействие сайта, взаимодействующего с антигеном, и его специфического антигена может приводить к возникновению сигнала, например, вследствие индукции изменения конформации антигена, олигомеризации антигена и т. п.

Термин "вариабельный" относится к частям доменов антител или иммуноглобулинов, у которых проявляется вариабельность их последовательности, и которые участвуют в определении специфичности и аффинности связывания конкретного антитела (т. е. "вариабельному(-ым) домену(-ам)"). Посредством спаривания вариабельного участка тяжелой цепи (VH) и вариабельного участка легкой цепи (VL) образуется единый антигенсвязывающий сайт.

Вариабельность неравномерно распределена на протяжении вариабельных доменов

антител; она сконцентрирована в субдоменах каждого из переменных участков тяжелой и легкой цепей. Эти субдомены называются "гиперпеременными участками" или "участками, определяющими комплементарность" (CDR). Более консервативные (т. е. не являющиеся гиперпеременными) участки переменных доменов называются "каркасными" участками (FRM или FR), и они обеспечивают каркас для шести CDR в трехмерном пространстве с образованием антигенсвязывающей поверхности. Каждый из встречающихся в природе переменных доменов тяжелой и легкой цепей содержит четыре участка FRM (FR1, FR2, FR3 и FR4), большей частью принимающие β -складчатую конфигурацию, соединенные тремя гиперпеременными участками, которые образуют петли, соединяющие и в некоторых случаях образующие часть β -складчатой структуры. Гиперпеременные участки в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости с помощью FRM и вместе с гиперпеременными участками другой цепи вносят вклад в образование антигенсвязывающего участка (см. Kabat *et al.*, *loc. cit.*).

Термин "CDR" в единственном и множественном числе относится к участкам, определяющим комплементарность, три из которых придают связывающий характер переменному участку легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3), а еще три придают связывающий характер переменному участку тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3). CDR содержат большинство остатков, отвечающих за специфические взаимодействия антитела с антигеном и, следовательно, вносят свой вклад в функциональную активность молекулы антитела: они являются основными детерминантами специфичности к антигену.

Точное определение границ и длин CDR является предметом разных классификаций и систем нумерации. Соответственно, CDR могут быть указаны согласно Kabat, Chothia, контактной или любой другой системе определения границ, включая систему нумерации, описанную в данном документе. Несмотря на отличия в границах, каждая из этих систем имеет определенную степень перекрытия в том, что составляет так называемые "гиперпеременные участки" в пределах последовательностей переменных доменов. Следовательно, определения CDR в соответствии с этими системами могут отличаться по длине и граничным областям с точки зрения прилегающего каркасного участка. См. например Kabat (подход, основанный на межвидовой изменчивости последовательностей), Chothia (подход, основанный на кристаллографических исследованиях комплексов антиген-антитело) и/или MacCallum (Kabat *et al.*, *loc. cit.*; Chothia *et al.*, J. Mol. Biol, 1987, 196: 901-917; и MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol, 1996, 262: 732). Еще одним стандартом для характеристики антигенсвязывающего сайта является определение AbM, используемое в программном обеспечении для моделирования антител AbM от Oxford Molecular. См., например, Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. B: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). В случае, если две методики идентификации остатков определяют участки как перекрывающиеся, но не идентичные участки, их можно комбинировать для определения гибридной CDR. Однако нумерация в соответствии с так называемой системой Kabat является предпочтительной.

Как правило, CDR образуют петлевую структуру, которая может быть классифицирована как каноническая структура. Термин "каноническая структура" относится к основной конформации цепи, принимаемой антигенсвязывающими петлями (CDR). По результатам сравнительных структурных исследований было обнаружено, что пять из шести антигенсвязывающих петель характеризуются только ограниченным набором доступных конформаций. Каждая каноническая структура может характеризоваться углами кручения полипептидного скелета. Следовательно, соответствующие петли у разных антител могут характеризоваться высокой степенью подобия трехмерных структур, несмотря на высокую вариабельность аминокислот в большинстве частей петель (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 1987, 196: 901; Chothia *et al.*, Nature, 1989, 342: 877; Martin and Thornton, J. Mol. Biol, 1996, 263: 800). Кроме того, существует взаимосвязь между структурой, принимаемой петлей, и окружающими ее аминокислотными последовательностями. Конформация конкретного канонического класса определяется длиной петли и аминокислотными остатками, находящимися в ключевых положениях в пределах петли, а также в пределах консервативного каркасного участка (т. е. за пределами петли). Таким образом, отнесение к конкретному каноническому классу можно проводить на основании присутствия этих ключевых аминокислотных остатков.

Термин "каноническая структура" может также включать аспекты, относящиеся к линейной последовательности антитела, например перечисленные в Kabat (Kabat *et al.*, loc. cit.). Схема (система) нумерации по Kabat является широко распространенным стандартом нумерации аминокислотных остатков варибельного домена антитела последовательным образом и является предпочтительной схемой, применяемой в данном изобретении, что также упоминается в другом месте данного документа. Для определения канонической структуры антитела также можно использовать дополнительные аспекты структуры. Например, различия, не в полной мере отображаемые системой нумерации по Kabat, можно описать с помощью системы нумерации по Chothia *et al.* и/или выявить с помощью других методик, например, кристаллографии или двух- или трехмерного компьютерного моделирования. Соответственно, указанную последовательность антитела можно поместить в канонический класс, что позволяет, среди прочего, проводить идентификацию соответствующих последовательностей каркасных участков (например, на основании необходимости включения разнообразных канонических структур в библиотеку). Система нумерации аминокислотных последовательностей антител по Kabat и структурные аспекты, описанные Chothia *et al. loc. cit.*, а также их значение для толкования канонических разновидностей структуры антител описаны в литературе. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны из уровня техники. Обзор структуры антител см. в *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow *et al.*, 1988.

CDR3 легкой цепи и, в особенности, CDR3 тяжелой цепи могут составлять наиболее важные детерминанты связывания антигена в пределах варибельных участков легкой и

тяжелой цепей. В некоторых конструкциях на основе антител CDR3 тяжелой цепи, по-видимому, составляет основную область контакта между антигеном и антителом. Схемы *in vitro* отбора, в которых изменяется только CDR3, могут применяться для изменения свойств связывания антитела или определения того, какие остатки вносят вклад в связывание антигена. Следовательно, CDR3, как правило, является самым большим источником молекулярного разнообразия в пределах связывающего сайта антитела. Например, длина H3 может составлять всего два аминокислотных остатка или более 26 аминокислот.

В классическом полноразмерном антителе или иммуноглобулине каждая легкая (L) цепь связана с тяжелой (H) цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как две H-цепи связаны друг с другом одной или несколькими дисульфидными связями в зависимости от изотипа H-цепи. Домен CH, расположенный наиболее близко к VH, обычно обозначается как CH1. Константные домены ("C") не принимают непосредственного участия в связывании с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, такие как, антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность и активация системы комплемента. Fc-участок антитела содержится в пределах константных доменов тяжелой цепи и, например, способен взаимодействовать с Fc-рецепторами, расположенными на поверхности клетки.

Последовательность генов антител после сборки и соматических мутаций является очень изменчивой, и эти изменчивые гены по оценкам кодируют 10^{10} различных молекул антител (Immunoglobulin Genes, 2nd ed., eds. Jonio et al., Academic Press, San Diego, CA, 1995). Соответственно, иммунная система обеспечивает репертуар иммуноглобулинов. Термин "репертуар" относится к по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, полученной, полностью или частично, из по меньшей мере одной последовательности, кодирующей по меньшей мере один иммуноглобулин. Последовательность(-и) может генерироваться путем *in vivo* реаранжировки V-, D- и J-сегментов генов тяжелых цепей и V- и J-сегментов генов легких цепей. В качестве альтернативы, последовательность(-и) можно получать из клетки, в которой происходит реаранжировка, например, в ответ на стимуляцию *in vitro*. В альтернативном варианте часть или всю последовательность(-и) можно получать посредством сплайсинга ДНК, нуклеотидного синтеза, мутагенеза и других способов, см., например, патент США 5565332. Репертуар может включать только одну последовательность или может включать совокупность последовательностей, включая последовательности из генетически разнородной коллекции.

В сочетании с настоящим изобретением термин "Fc-часть" или "Fc-мономер" означает полипептид, содержащий по меньшей мере один домен, характеризующийся функцией домена CH2, и по меньшей мере один домен, характеризующийся функцией домена CH3 молекулы иммуноглобулина. Как очевидно из термина "Fc-мономер", полипептид, содержащий эти домены CH, представляет собой "полипептидный мономер". Fc-мономер может представлять собой полипептид, содержащий по меньшей мере фрагмент константного участка иммуноглобулина за исключением первого домена константного участка тяжелой цепи иммуноглобулина (CH1), но сохраняющий по меньшей

мере функциональную часть одного домена СН2 и функциональную часть одного домена СН3, причем домен СН2 является аминоконцевым по отношению к домену СН3. В предпочтительном аспекте этого определения Fc-мономер может представлять собой полипептидный константный участок, содержащий часть шарнирного участка Ig-Fc, участок СН2 и участок СН3, причем шарнирный участок является аминоконцевым по отношению к домену СН2. Подразумевается, что шарнирный участок по настоящему изобретению способствует димеризации. Такие молекулы Fc-полипептидов можно получать, например и без ограничения, путем расщепления папаином участка иммуноглобулина (что, конечно, дает димер из двух Fc-полипептидов). В другом аспекте этого определения Fc-мономер может представлять собой полипептидный участок, содержащий часть участка СН2 и участок СН3. Такие молекулы Fc-полипептидов можно получать, например и без ограничения путем расщепления пепсином молекулы иммуноглобулина. В одном варианте осуществления полипептидная последовательность Fc-мономера является практически аналогичной последовательности Fc-полипептида: Fc-участка IgG₁, Fc-участка IgG₂, Fc-участка IgG₃, Fc-участка IgG₄, Fc-участка IgM, Fc-участка IgA, Fc-участка IgD и Fc-участка IgE. (См., например, Padlan, *Molecular Immunology*, 31(3), 169-217 (1993)). Из-за существования некоторой вариабельности между иммуноглобулинами и исключительно для ясности Fc-мономер означает последние два домена константного участка тяжелой цепи иммуноглобулинов IgA, IgD и IgG и последние три домена константного участка тяжелой цепи иммуноглобулинов IgE и IgM. Как упоминалось, Fc-мономер также может содержать гибкий шарнирный участок на N-конце этих доменов. В случае IgA и IgM Fc-мономер может включать J-цепь. В случае IgG Fc-часть содержит домены СН2 и СН3 иммуноглобулина и шарнирный участок между первыми двумя доменами и СН2. Хотя границы Fc-части могут варьироваться, например, в случае Fc-части тяжелой цепи IgG человека, содержащей функциональный шарнирный участок, домены СН2 и СН3 могут быть определены, например, как содержащие остатки от D231 (шарнирного домена - соответствует D234 в таблице 1 ниже) до P476, соответственно L476 (для IgG₄), представляющего собой карбокси-конец домена СН3, где нумерация используется в соответствии с Kabat. Две Fc-части или два Fc-мономера, слитые друг с другом посредством пептидного линкера, определяют третий домен конструкции на основе антитела по настоящему изобретению, который также может быть определен как домен scFc.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения подразумевается, что scFc, раскрытый в данном документе, соответственно Fc-мономеры, слитые друг с другом, находятся только в третьем домене конструкции на основе антитела.

В соответствии с настоящим изобретением шарнирный участок IgG можно определить по аналогии, используя нумерацию по Kabat, приведенную в таблице 1. В соответствии с вышеизложенным предполагается, что шарнирный домен/участок по настоящему изобретению содержит аминокислотные остатки, соответствующие сегменту последовательности IgG₁ от D234 до P243 согласно нумерации по Kabat. Аналогично

подразумевается, что шарнирный домен/участок по настоящему изобретению содержит или состоит из последовательности шарнирного участка IgG1, DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 182) (соответствует сегменту от D234 до P243, показанному в таблице 1 ниже - также предусмотрены варианты указанной последовательности при условии, что шарнирный участок по-прежнему способствует димеризации). В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения сайт гликозилирования в положении 314 по Kabat доменов CH2 в третьем домене конструкции на основе антитела удален путем замены N314X, где X представляет собой любую аминокислоту кроме Q. Предпочтительно указанная замена представляет собой замену N314G. В более предпочтительном варианте осуществления по настоящему изобретению указанный домен CH2 дополнительно содержит следующие замены (положения в соответствии с Kabat): V321C и R309C (эти замены вводят внутридоменный цистеиновый дисульфидный мостик в позициях 309 и 321 по Kabat).

Также подразумевается, что третий домен конструкции на основе антитела по настоящему изобретению содержит или включает следующее в направлении от аминоконца к карбоксильному концу: DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 182) (т. е. шарнирный участок)-CH2-CH3-линкер-DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 182) (т. е. шарнирный участок) -CH2-CH3. В предпочтительном варианте осуществления пептидный линкер из вышеупомянутой конструкции на основе антитела характеризуется аминокислотной последовательностью Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, т. е. Gly₄Ser (SEQ ID NO: 187), или ее полимерами, т. е. (Gly₄Ser)_x, где x составляет целое число 5 или более (например 5, 6, 7, 8 и т. д. или более), при этом предпочтительным является 6 ((Gly₄Ser)₆). Указанная конструкция может дополнительно содержать вышеупомянутые замены N314X, предпочтительно N314G, и/или дополнительные замены V321C и R309C. В предпочтительном варианте осуществления конструкций на основе антител по настоящему изобретению, как определено в данном документе ранее, предусматривается, что второй домен связывается с внеклеточным эпитопом цепи CD3ε человека и/или *Macaca*.

Таблица 1. Нумерация по Kabat аминокислотных остатков шарнирного участка

Нумерация IMGT для шарнирного участка	Перевод в аминокислоту для IgG ₁	Нумерация по Kabat
1	I	226
2	P	227
3	K	228
4	S	232
5	C	233
6	D	234
7	K	235
8	T	236

9	H	237
10	T	238
11	C	239
12	P	240
13	P	241
14	C	242
15	P	243

В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения шарнирный домен/участок содержит или состоит из последовательности шарнирного участка подтипа IgG2, ERKCCVECPCPCP (SEQ ID NO: 183), последовательности шарнирного участка подтипа IgG3, ELKTPLDTHHTCPCPCP (SEQ ID NO: 184) или ELKTPLGDTTHHTCPCPCP (SEQ ID NO: 185), и/или последовательности шарнирного участка подтипа IgG4, ESKYGPPCPCPCP (SEQ ID NO: 186). Последовательность шарнирного участка подтипа IgG1 может быть следующей: EPKSCDKTHTCPCPCP (показанной в таблице 1 и SEQ ID NO: 183). Таким образом, эти коровые шарнирные участки также подразумеваются в контексте настоящего изобретения.

Положение и последовательность домена CH2 IgG и домена CH3 IgG можно идентифицировать по аналогии, используя нумерацию по Kabat, показанную в таблице 2.

Таблица 2. Нумерация по Kabat аминокислотных остатков участка CH2 и CH3 IgG

Подтип IgG	Перевод в аминокислоты CH2	Нумерация CH2 по Kabat	Перевод в аминокислоты CH3	Нумерация CH3 по Kabat
IgG₁	APE... ..KAK	244... ..360	GQP.....PGK	361... ..478
IgG₂	КАЖУЩИЙСЯ... ...KTK	244... ..360	GQP.....PGK	361... ..478
IgG₃	APE... ..KTK	244... ..360	GQP.....PGK	361... ..478
IgG₄	APE... ..KAK	244... ..360	GQP.....LGK	361... ..478

В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенные жирным шрифтом аминокислотные остатки в домене CH3 первого или обоих Fc-мономеров удалены.

Пептидный линкер, посредством которого полипептидные мономеры ("Fc-часть" или "Fc-мономер") третьего домена слиты друг с другом, предпочтительно содержит по меньшей мере 25 аминокислотных остатков (25, 26, 27, 28, 29, 30 и т. д.). Более предпочтительно этот пептидный линкер содержит по меньшей мере 30 аминокислотных остатков (30, 31, 32, 33, 34, 35 и т. д.). Также предпочтительно, чтобы линкер содержал до 40 аминокислотных остатков, более предпочтительно до 35 аминокислотных остатков, наиболее предпочтительно ровно 30 аминокислотных остатков. Предпочтительным

вариантом осуществления такого пептидного линкера является вариант, характеризующийся аминокислотной последовательностью Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, т. е. Gly₄Ser (SEQ ID NO: 187), или ее полимерами, т. е. (Gly₄Ser)_x, где x составляет целое число 5 или более (например 6, 7 или 8). Предпочтительно целое число составляет 6 или 7, более предпочтительно целое число составляет 6.

В случае, если для слияния первого домена со вторым доменом или первого или второго домена с третьим доменом используется линкер, этот линкер предпочтительно имеет длину и последовательность, достаточные, чтобы гарантировать, что каждый из первого и второго доменов независимо от другого может сохранять свою дифференциальную специфичность связывания. Для пептидных линкеров, которые связывают по меньшей мере два связывающих домена (или два переменных домена) в конструкции на основе антитела по настоящему изобретению, предпочтительными пептидными линкерами являются те, которые содержат лишь несколько аминокислотных остатков, например, 12 аминокислотных остатков или менее. Таким образом, предпочтительными являются пептидные линкеры из 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 аминокислотных остатков. Подразумеваемый пептидный линкер с менее чем 5 аминокислотами содержит 4, 3, 2 или одну аминокислоту, причем предпочтительными являются богатые Gly линкеры. Предпочтительный вариант осуществления пептидного линкера для слияния первого и второго домена приведен под SEQ ID NO:1. Предпочтительный линкер в варианте осуществления пептидного линкера для слияния второго и третьего домена представляет собой (Gly)₄-линкер, соответственно G₄-линкер.

Особенно предпочтительной "единственной" аминокислотой в контексте одного из вышеописанных "пептидных линкеров" является Gly. Соответственно, указанный пептидный линкер может состоять из единственной аминокислоты Gly. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения пептидный линкер характеризуется аминокислотной последовательностью Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, т. е. Gly₄Ser (SEQ ID NO: 187), или ее полимерами, т. е. (Gly₄Ser)_x, где x составляет целое число 1 или более (например, 2 или 3). Предпочтительные линкеры показаны под SEQ ID NO: от 1 до 12. Характеристики указанного пептидного линкера, которые предусматривают отсутствие содействия образованию вторичных структур, известны из уровня техники и описаны, например, в Dall'Acqua et al. (Biochem. (1998) 37, 9266-9273), Cheadle et al. (Mol Immunol (1992) 29, 21-30) и Raag and Whitlow (FASEB (1995) 9(1), 73-80). Предпочтительными являются пептидные линкеры, которые, помимо прочего, не содействуют образованию каких-либо вторичных структур. Связь указанных доменов друг с другом может быть обеспечена, например, с помощью генной инженерии, как описано в примерах. Способы получения слитых и функционально связанных биспецифических одноцепочечных конструкций и обеспечения их экспрессии в клетках млекопитающих или бактерий хорошо известны из уровня техники (например, WO 99/54440 или Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001).

В предпочтительном варианте осуществления конструкции на основе антитела по настоящему изобретению первый и второй домены образуют конструкцию на основе антитела в формате, выбранном из группы, состоящей из (scFv)₂, scFv-однодоменного mAb, диатела и олигомеров в любом из этих форматов.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления и как документально подтверждено в прилагаемых примерах, первый и второй домен конструкции на основе антитела по настоящему изобретению представляет собой "конструкцию на основе биспецифического одноцепочечного антитела", более предпочтительно биспецифический "одноцепочечный Fv" (scFv). Хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, их можно соединить с применением рекомбинантных способов с помощью синтетического линкера, описанного в данном документе выше, позволяющего им образовывать единую белковую цепь, в которой VL- и VH-участки спариваются с образованием моновалентной молекулы; см. например, Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883). Эти фрагменты антител получают, применяя традиционные методики, известные специалистам в данной области, и фрагменты оценивают в отношении функции таким же образом, как и целые или полноразмерные антитела. Следовательно, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) представляет собой слитый белок вариабельного участка тяжелой цепи (VH) и легкой цепи (VL) иммуноглобулинов, обычно соединенных коротким линкерным пептидом длиной от приблизительно десяти до приблизительно 25 аминокислот, предпочтительно от приблизительно 15 до 20 аминокислот. Линкер обычно богат глицином для обеспечения гибкости, а также серином или треонином для обеспечения растворимости и может либо соединять N-конец VH с C-концом VL, либо наоборот. Этот белок сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление константных участков и введение линкера.

Конструкции на основе биспецифических одноцепочечных антител известны из уровня техники и описаны в WO 99/54440, Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-3970, Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-7025, Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-197, Löffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-2103, Brühl, Immunol., (2001), 166, 2420-2426, Kipriyanov, J. Mol. Biol., (1999), 293, 41-56. Методики, описанные для получения одноцепочечных антител (см., среди прочего, патент США 4946778, Kontermann and Dübel (2010), *loc. Cit.* и Little (2009), *loc. Cit.*) можно адаптировать для получения конструкций на основе одноцепочечных антител, специфически распознающих выбранную(-ые) мишень(-и).

Бивалентные (также называемые двухвалентными) или биспецифические одноцепочечные вариабельные фрагменты (би-scFv или ди-scFv в формате (scFv)₂) могут быть сконструированы путем связывания двух молекул scFv (например, с помощью линкеров, описанных в данном документе выше). Если эти две молекулы scFv имеют одинаковую специфичность связывания, то полученная молекула (scFv)₂ предпочтительно будет называться бивалентной (т. е. она имеет две валентности для одного и того же эпитопа-мишени). Если две молекулы scFv характеризуются разной специфичностью

связывания, то полученная молекула (scFv)₂ предпочтительно будет называться биспецифической. Связывание можно осуществлять путем получения одной пептидной цепи с двумя участками VH и двумя участками VL, что дает тандемные scFv (см., например, Kufer P. *et al.*, (2004) Trends in Biotechnology 22(5):238-244). Другой возможностью является создание молекул scFv с линкерными пептидами, которые являются слишком короткими для того, чтобы два переменных участка складывались вместе (например, приблизительно пять аминокислот), что вынуждает scFv димеризоваться. Этот тип известен как диатела (см., например, Hollinger, Philipp *et al.*, (July 1993) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90 (14): 6444-8).

В соответствии с настоящим изобретением любой из первого, второго или первый и второй домен могут составлять однодоменное антитело, переменный домен или по меньшей мере CDR однодоменного антитела соответственно. Однодоменные антитела содержат только один (мономерный) переменный домен антитела, который способен селективно связываться со специфическим антигеном, независимо от других V-участков или доменов. Первые однодоменные антитела были сконструированы из тяжелой цепи антител, выявленных у верблюдовых, и они называются V_HH-фрагментами. Хрящевые рыбы также имеют антитела из тяжелой цепи (IgNAR), из которых можно получать однодоменные антитела, называемые V_{NAR}-фрагментами. Альтернативный подход заключается в разделении димерных переменных доменов обычных иммуноглобулинов, например, человека или грызунов, на мономеры с получением, VH или VL соответственно в качестве однодоменного Ab. Хотя большинство исследований однодоменных антител в настоящее время основано на переменных доменах тяжелой цепи, также было показано, что нанотела, полученные из легких цепей, специфически связываются с эпитопами-мишенями. Примеры однодоменных антител называются sdAb, нанотелами или антителами с единственным переменным доменом.

Следовательно, (однодоменное mAb)₂ представляет собой конструкцию на основе моноклонального антитела, состоящую из (по меньшей мере) двух однодоменных моноклональных антител, которые по отдельности выбраны из группы, включающей V_H, V_L, V_HH и V_{NAR}. Линкер предпочтительно находится в форме пептидного линкера. Аналогично "scFv-однодоменное mAb" представляет собой конструкцию на основе моноклонального антитела, состоящую из по меньшей мере одного однодоменного антитела, описанного выше, и одной молекулы scFv, описанной выше. Опять же линкер предпочтительно находится в форме пептидного линкера.

Конкурирует ли конструкция на основе антитела за связывание с другой указанной конструкцией на основе антитела, можно определить в конкурентном анализе, таком как конкурентный ELISA или конкурентный анализ на основе клеток. Также можно применять покрытые авидином микрочастицы (гранулы). Аналогично покрытому авидином планшету для ELISA при проведении реакции с биотинилированным белком каждая из этих гранул может применяться в качестве субстрата, на котором может проводиться анализ. Антигеном покрывают гранулу, а затем ее предварительно покрывают первым антителом.

Добавляют второе антитело и определяют присутствие какого-либо дополнительного связывания. Возможные средства для считывания данных включают проточную цитометрию.

Т-клетки или Т-лимфоциты представляют собой тип лимфоцитов (которые сами по себе представляют тип лейкоцитов), который играет центральную роль в клеточноопосредованном иммунитете. Существует несколько подгрупп Т-клеток, каждая из которых имеет свою функцию. Т-клетки можно отличить от других лимфоцитов, таких как В-клетки и NK-клетки, по присутствию Т-клеточного рецептора (TCR) на клеточной поверхности. TCR отвечает за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС), и состоит из двух разных белковых цепей. В 95% Т-клеток TCR состоит из цепи альфа (α) и бета (β). Когда TCR вступает в контакт с антигенным пептидом и молекулой МНС (комплекс пептид/ молекула МНС), происходит активация Т-лимфоцита посредством серии биохимических событий, опосредованных ассоциированными ферментами, корецепторами, специализированными адапторными молекулами и активированными или высвобожденными транскрипционными факторами.

Комплекс CD3-рецептора представляет собой белковый комплекс и состоит из четырех цепей. У млекопитающих комплекс содержит цепь CD3 γ (гамма), цепь CD3 δ (дельта) и две цепи CD3 ϵ (эпсилон). Эти цепи связываются с Т-клеточным рецептором (TCR) и так называемой цепью ζ (дзета) с образованием комплекса Т-клеточного рецептора и CD3 и генерацией сигнала активации в Т-лимфоцитах. Цепи CD3 γ (гамма), CD3 δ (дельта) и CD3 ϵ (эпсилон) представляют собой высокородственные белки клеточной поверхности суперсемейства иммуноглобулинов, содержащие один внеклеточный домен иммуноглобулина. Внутриклеточные хвосты молекул CD3 содержат единый консервативный мотив, известный как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или сокращенно ITAM, который является ключевым для функции сигнального пути TCR. Молекула CD3-эпсилон представляет собой полипептид, который у человека кодируется геном *CD3E*, который расположен на хромосоме 11. Наиболее предпочтительный эпитоп CD3-эпсилон содержится в пределах аминокислотных остатков 1-27 внеклеточного домена CD3-эпсилон человека. Подразумевается, что конструкции на основе антител в соответствии с данным изобретением, как правило и преимущественно, в меньшей степени проявляют неспецифическую активацию Т-клеток, которая является нежелательной при специфической иммунотерапии. Это приводит к снижению риска возникновения побочных явлений.

Перенаправленный лизис клеток-мишеней посредством привлечения Т-клеток с помощью конструкции на основе мультиспецифического, по меньшей мере биспецифического антитела, включает образование цитолитического синапса и доставку перфорина и гранзимов. Рекрутированные Т-клетки способны к последовательному лизису клеток-мишеней и на них не действуют механизмы уклонения от иммунологического надзора, препятствующие процессингу и презентации пептидных антигенов или клональной дифференцировке Т-клеток; см., например, WO 2007/042261.

Цитотоксичность, опосредованную конструкциями на основе антител по настоящему изобретению, можно измерять различными методами. Эффекторные клетки могут представлять собой, например, простимулированные обогащенные CD8-положительные Т-клетки (человека) или непростимулированные моноклеарные клетки периферической крови (РВМС) (человека). Если клетки-мишени получены от макака или экспрессируют поверхностный антиген клетки-мишени макака либо трансфицированы им, причем этот антиген связывает первый домен, эффекторные клетки также должны быть получены от макака, как, например, представлять собой линию Т-клеток макака, например, 4119LnPx. Клетки-мишени должны экспрессировать поверхностный антиген клетки-мишени (по меньшей мере его внеклеточный домен), например, поверхностный антиген клетки-мишени человека или макака. Клетки-мишени могут представлять собой линию клеток (таких как клетки CHO), стабильно или временно трансфицированных поверхностным антигеном клетки-мишени, например, поверхностным антигеном клетки-мишени человека или макака. В качестве альтернативы клетки-мишени могут представлять собой линию клеток, положительную по поверхностному антигену клетки-мишени вследствие естественной экспрессии. Обычно ожидается, что значения EC₅₀ будут более низкими для линий целевых клеток, экспрессирующих поверхностный антиген клетки-мишени на поверхности клетки на более высоких уровнях. Соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней (Е:Т) обычно составляет приблизительно 10:1, но также может варьироваться. Цитотоксическую активность конструкций на основе биспецифических антител к поверхностному антигену клетки-мишени xCD3 можно измерить в анализе высвобождения ⁵¹Cr (время инкубирования приблизительно 18 часов) или в анализе цитотоксичности на основе FACS (время инкубирования приблизительно 48 часов). Также возможны модификации времени инкубации (цитотоксической реакции) в анализе. Другие способы определения цитотоксичности хорошо известны специалистам и включают МТТ-или МТС-анализ, анализы на основе АТФ, включая билюминесцентный анализ, анализ с сульфородамино В (SRB), анализ WST, клоногенный анализ и методику ECIS.

Цитотоксическую активность, опосредованную конструкциями на основе биспецифических антител к поверхностному антигену клетки-мишени xCD3 по настоящему изобретению, предпочтительно измеряют в клеточном анализе цитотоксичности. Это также можно измерить в анализе высвобождения ⁵¹Cr. Это представлено значением EC₅₀, которое соответствует полумаксимальной эффективной концентрации (концентрации конструкции на основе антитела, индуцирующей половинную цитотоксическую реакцию между исходным уровнем и максимумом). Предпочтительно значение EC₅₀ для конструкций на основе биспецифических антител к поверхностному антигену клетки-мишени x CD3 составляет ≤5000 пМ или ≤4000 пМ, более предпочтительно ≤3000 пМ или ≤2000 пМ, еще более предпочтительно ≤1000 пМ или ≤500 пМ, еще более предпочтительно ≤400 пМ или ≤300 пМ, еще более предпочтительно ≤200 пМ, еще более предпочтительно ≤100 пМ, еще более предпочтительно ≤50 пМ, еще более предпочтительно ≤20 пМ или ≤10 пМ и наиболее предпочтительно ≤5 пМ.

Указанные выше значения EC_{50} могут быть получены в различных анализах. Специалисту в данной области известно, что можно ожидать, что значение EC_{50} будет ниже, если в качестве эффекторных клеток применяются простимулированные/обогащенные $CD8^+$ Т-клетки в сравнении с непростимулированными РВМС. Кроме того, можно ожидать, что значения EC_{50} будут ниже, если клетки-мишени экспрессируют большое количество поверхностного антигена клетки-мишени в сравнении с низким уровнем экспрессии мишени. Например, если в качестве эффекторных клеток используются простимулированные/обогащенные $CD8^+$ Т-клетки человека (и в качестве клеток-мишеней применяются либо клетки, трансфицированные поверхностным антигеном клетки-мишени, такие как клетки СНО, либо линии клеток человека, положительные по поверхностному антигену клетки-мишени), значение EC_{50} для конструкции на основе биспецифического антитела к поверхностному антигену клетки-мишени x CD3 составляет предпочтительно ≤ 1000 пМ, более предпочтительно ≤ 500 пМ, еще более предпочтительно ≤ 250 пМ, еще более предпочтительно ≤ 100 пМ, еще более предпочтительно ≤ 50 пМ, еще более предпочтительно ≤ 10 пМ и наиболее предпочтительно ≤ 5 пМ. Если в качестве эффекторных клеток используются РВМС человека, значение EC_{50} для конструкции на основе биспецифического антитела к поверхностному антигену клетки-мишени x CD3 составляет предпочтительно ≤ 5000 пМ или ≤ 4000 пМ (в частности, когда клетками-мишенями являются линии клеток человека, положительные по поверхностному антигену клетки-мишени), более предпочтительно ≤ 2000 пМ (в частности, когда клетками-мишенями являются клетки, трансфицированные поверхностным антигеном клетки-мишени, такие как клетки СНО), более предпочтительно ≤ 1000 пМ или ≤ 500 пМ, еще более предпочтительно ≤ 200 пМ, еще более предпочтительно ≤ 150 пМ, еще более предпочтительно ≤ 100 пМ и наиболее предпочтительно ≤ 50 пМ или ниже. Если в качестве эффекторных клеток применяют линию Т-клеток макака, такую как LnPx4119, а в качестве линии клеток-мишеней применяют линию клеток, трансфицированных поверхностным антигеном клетки-мишени макака, такую как клетки СНО, то значение EC_{50} для конструкции на основе биспецифического антитела к поверхностному антигену клетки-мишени x CD3 составляет предпочтительно ≤ 2000 пМ или ≤ 1500 пМ, более предпочтительно ≤ 1000 пМ или ≤ 500 пМ, еще более предпочтительно ≤ 300 пМ или ≤ 250 пМ, еще более предпочтительно ≤ 100 пМ и наиболее предпочтительно ≤ 50 пМ.

Предпочтительно конструкции на основе биспецифических антител к поверхностному антигену клетки-мишени x CD3 по настоящему изобретению не индуцируют/не опосредуют лизис или фактически не индуцируют/не опосредуют лизис клеток, отрицательных по поверхностному антигену клетки-мишени, таких как клетки СНО. Термин "не индуцирует лизис", "фактически не индуцирует лизис", "не опосредует лизис" или "фактически не опосредует лизис" означает, что конструкция на основе антитела по настоящему изобретению индуцирует или опосредует лизис не более 30%, предпочтительно не более 20%, более предпочтительно не более 10%, особенно предпочтительно не более 9%, 8%, 7%, 6% или 5% клеток, отрицательных по

поверхностному антигену клетки-мишени, при этом лизис линии клеток человека, положительных по поверхностному антигену клетки-мишени, принят за 100%. При этом обычно применяют концентрации конструкций на основе антитела, составляющие не более 500 нМ. Специалисту в данной области известно, как измерить лизис клеток без излишних усилий. Кроме того, в данном описании приведены специфические инструкции для измерения лизиса клеток.

Различие в цитотоксической активности между мономерной и димерной изоформами отдельных конструкций на основе биспецифических антител к поверхностному антигену клетки-мишени х CD3 называют "расхождением в эффективности". Например, это расхождение в эффективности можно рассчитать как соотношение значений ЕС₅₀ для мономерной и димерной формы молекулы. Расхождение в эффективности конструкций на основе биспецифических антител к поверхностному антигену клетки-мишени х CD3 по настоящему изобретению составляет предпочтительно ≤ 5 , более предпочтительно ≤ 4 , еще более предпочтительно ≤ 3 , еще более предпочтительно ≤ 2 и наиболее предпочтительно ≤ 1 .

Первый и/или второй (или любой дополнительный) связывающий домен(-ы) конструкции на основе антитела по настоящему изобретению предпочтительно характеризуются межвидовой специфичностью для представителей отряда приматов класса млекопитающих. CD3-связывающие домены, характеризующиеся межвидовой специфичностью, описаны, например, в WO 2008/119567. В соответствии с одним вариантом осуществления первый и/или второй связывающий домен в дополнение к связыванию с поверхностным антигеном клетки-мишени человека и CD3 человека соответственно также будет связываться с поверхностным антигеном клетки-мишени/CD3 приматов, включая (без ограничения) приматов нового света (таких как *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* или *Saimiri sciureus*), приматов старого света (таких как бабуины и макаки), гиббонов и отличных от человека представителей *homininae*.

В одном варианте осуществления конструкции на основе антитела по настоящему изобретению первый домен связывается с поверхностным антигеном клетки-мишени человека и дополнительно связывается с поверхностным антигеном клетки-мишени макака, таким как поверхностный антиген клетки-мишени *Macaca fascicularis*, и более предпочтительно поверхностным антигеном клетки-мишени макака, экспрессирующимся на поверхности клеток макака. Аффинность первого связывающего домена с поверхностным антигеном клетки-мишени макака составляет предпочтительно ≤ 15 нМ, более предпочтительно ≤ 10 нМ, еще более предпочтительно ≤ 5 нМ, еще более предпочтительно ≤ 1 нМ, еще более предпочтительно $\leq 0,5$ нМ, еще более предпочтительно $\leq 0,1$ нМ и наиболее предпочтительно $\leq 0,05$ нМ или даже $\leq 0,01$ нМ.

Предпочтительно расхождение в аффинности конструкций на основе антител в соответствии с настоящим изобретением при связывании поверхностного антигена клетки-мишени макака в сравнении с поверхностным антигеном клетки-мишени человека [поверхностный антиген клетки-мишени макака : поверхностный антиген клетки-мишени

человека] (как определено, например, с помощью ViaCore или с помощью анализа Scatchard) составляет <100, предпочтительно <20, более предпочтительно <15, дополнительно предпочтительно <10, даже более предпочтительно <8, более предпочтительно <6 и наиболее предпочтительно <2. Предпочтительные диапазоны для расхождения в аффинности конструкций на основе антител в соответствии с настоящим изобретением для связывания поверхностного антигена клетки-мишени макака по сравнению с поверхностным антигеном клетки-мишени человека составляют от 0,1 до 20, более предпочтительно от 0,2 до 10, еще более предпочтительно от 0,3 до 6, еще более предпочтительно от 0,5 до 3 или от 0,5 до 2,5 и наиболее предпочтительно от 0,5 до 2 или от 0,6 до 2.

Второй (связывающий) домен конструкции на основе антитела по настоящему изобретению связывается с CD3-эпсилон человека и/или с CD3-эпсилон *Macaca*. В предпочтительном варианте осуществления второй домен дополнительно связывается с CD3-эпсилон *Callithrix jacchus*, *Saguinus Oedipus* или *Saimiri sciureus*. Оба из *Callithrix jacchus* и *Saguinus* ~~yophi~~*Oedipus* представляют собой приматов Нового Света, принадлежащих к семейству *Callitrichidae*, при этом *Saimiri sciureus* представляет собой примата Нового Света, принадлежащего к семейству *Cebidae*.

Для конструкции на антитела по настоящему изобретению предпочтительно, чтобы второй домен, который связывается с внеклеточным эпитопом CD3 человека и/или *Macaca*, содержал VL-участок, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из:

(a) CDR-L1, приведенного под SEQ ID NO: 27 в WO 2008/119567, CDR-L2, приведенного под SEQ ID NO: 28 в WO 2008/119567, и CDR-L3, приведенного под SEQ ID NO: 29 в WO 2008/119567;

(b) CDR-L1, приведенного под SEQ ID NO: 117 в WO 2008/119567, CDR-L2, приведенного под SEQ ID NO: 118 в WO 2008/119567, и CDR-L3, приведенного под SEQ ID NO: 119 в WO 2008/119567; и

I CDR-L1, приведенного под SEQ ID NO: 153 в WO 2008/119567, CDR-L2, приведенного под SEQ ID NO: 154 в WO 2008/119567, и CDR-L3, приведенного под SEQ ID NO: 155 в WO 2008/119567.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления конструкции на основе антитела по настоящему изобретению второй домен, который связывается с внеклеточным эпитопом цепи CD3-эпсилон человека и/или *Macaca*, содержит VH-участок, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, выбранные из:

(a) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 12 в WO 2008/119567, CDR-H2, приведенного под SEQ ID NO: 13 в WO 2008/119567, и CDR-H3, приведенного под SEQ ID NO: 14 в WO 2008/119567;

(b) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 30 в WO 2008/119567, CDR-H2, приведенного под SEQ ID NO: 31 в WO 2008/119567, и CDR-H3, приведенного под SEQ ID NO: 32 в WO 2008/119567;

I CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 48 в WO 2008/119567, CDR-H2,

приведенного под SEQ ID NO: 49 в WO 2008/119567, и CDR-H3, приведенного под SEQ ID NO: 50 в WO 2008/119567;

(d) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 66 в WO 2008/119567, CDR-H2, приведенного под SEQ ID NO: 67 в WO 2008/119567, и CDR-H3, приведенного под SEQ ID NO: 68 в WO 2008/119567;

I CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 84 в WO 2008/119567, CDR-H2, приведенного под SEQ ID NO: 85 в WO 2008/119567, и CDR-H3, приведенного под SEQ ID NO: 86 в WO 2008/119567;

(f) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 102 в WO 2008/119567, CDR-H2, приведенного под SEQ ID NO: 103 в WO 2008/119567, и CDR-H3, приведенного под SEQ ID NO: 104 в WO 2008/119567;

(g) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 120 в WO 2008/119567, CDR-H2, приведенного под SEQ ID NO: 121 в WO 2008/119567, и CDR-H3, приведенного под SEQ ID NO: 122 в WO 2008/119567;

(h) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 138 в WO 2008/119567, CDR-H2, приведенного под SEQ ID NO: 139 в WO 2008/119567, и CDR-H3, приведенного под SEQ ID NO: 140 в WO 2008/119567;

(i) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 156 в WO 2008/119567, CDR-H2, приведенного под SEQ ID NO: 157 в WO 2008/119567, и CDR-H3, приведенного под SEQ ID NO: 158 в WO 2008/119567; и

(j) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 174 в WO 2008/119567, CDR-H2, приведенного под SEQ ID NO: 175 в WO 2008/119567, и CDR-H3, приведенного под SEQ ID NO: 176 в WO 2008/119567.

В предпочтительном варианте осуществления конструкции на основе антитела по настоящему изобретению вышеописанные три группы VL CDR комбинируют с вышеописанными десятью группами VH CDR в пределах второго связывающего домена для получения (30) групп, каждая из которых содержит CDR-L 1-3 и CDR-H 1-3.

Для конструкции на основе антитела по настоящему изобретению предпочтительно, чтобы второй домен, который связывается с CD3, содержал VL-участок, выбранный из группы, состоящей из VL-участка, приведенного под SEQ ID NO: 17, 21, 35, 39, 53, 57, 71, 75, 89, 93, 107, 111, 125, 129, 143, 147, 161, 165, 179 или 183 в WO 2008/119567 или приведенного под SEQ ID NO: 200.

Также предпочтительно, чтобы второй домен, который связывается с CD3, содержал VH-участок, выбранный из группы, состоящей из VH-участка, приведенного под SEQ ID NO: 15, 19, 33, 37, 51, 55, 69, 73, 87, 91, 105, 109, 123, 127, 141, 145, 159, 163, 177 или 181 в WO 2008/119567 или приведенного под SEQ ID NO: 201.

Более предпочтительно конструкция на основе антитела по настоящему изобретению характеризуется вторым доменом, который связывается с CD3, содержащим VL-участок и VH-участок, выбранные из группы, состоящей из:

(a) VL-участка, приведенного под SEQ ID NO: 17 или 21 в WO 2008/119567, и VH-

участка, приведенного под SEQ ID NO: 15 или 19 в WO 2008/119567;

(b) VL-участка, приведенного под SEQ ID NO: 35 или 39 в WO 2008/119567, и VH-участка, приведенного под SEQ ID NO: 33 или 37 в WO 2008/119567;

I VL-участка, приведенного под SEQ ID NO: 53 или 57 в WO 2008/119567, и VH-участка, приведенного под SEQ ID NO: 51 или 55 в WO 2008/119567;

(d) VL-участка, приведенного под SEQ ID NO: 71 или 75 в WO 2008/119567, и VH-участка, приведенного под SEQ ID NO: 69 или 73 в WO 2008/119567;

I VL-участка, приведенного под SEQ ID NO: 89 или 93 в WO 2008/119567, и VH-участка, приведенного под SEQ ID NO: 87 или 91 в WO 2008/119567;

(f) VL-участка, приведенного под SEQ ID NO: 107 или 111 в WO 2008/119567, и VH-участка, приведенного под SEQ ID NO: 105 или 109 в WO 2008/119567;

(g) VL-участка, приведенного под SEQ ID NO: 125 или 129 в WO 2008/119567, и VH-участка, приведенного под SEQ ID NO: 123 или 127 в WO 2008/119567;

(h) VL-участка, приведенного под SEQ ID NO: 143 или 147 в WO 2008/119567, и VH-участка, приведенного под SEQ ID NO: 141 или 145 в WO 2008/119567;

(i) VL-участка, приведенного под SEQ ID NO: 161 или 165 в WO 2008/119567, и VH-участка, приведенного под SEQ ID NO: 159 или 163 в WO 2008/119567; и

(j) VL-участка, приведенного под SEQ ID NO: 179 или 183 в WO 2008/119567, и VH-участка, приведенного под SEQ ID NO: 177 или 181 в WO 2008/119567.

Также в сочетании с конструкцией на основе антитела по настоящему изобретению предпочтительно, чтобы второй домен, который связывается с CD3, содержал VL-участок, приведенный под SEQ ID NO: 200, и VH-участок, приведенный под SEQ ID NO: 201.

В соответствии с предпочтительным вариантом конструкции на основе антитела по настоящему изобретению первый и/или второй домен имеют следующий формат. Пары VH-участков и VL-участков находятся в формате одноцепочечного антитела (scFv). VH- и VL-участки расположены в порядке VH-VL или VL-VH. Предпочтительно, чтобы VH-участок был расположен на N-конце линкерной последовательности, а VL-участок был расположен на C-конце линкерной последовательности.

Предпочтительный вариант осуществления вышеописанной конструкции на основе антитела по настоящему изобретению характеризуется вторым доменом, который связывается с CD3, содержащим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO: 23, 25, 41, 43, 59, 61, 77, 79, 95, 97, 113, 115, 131, 133, 149, 151, 167, 169, 185 или 187 в WO 2008/119567 или приведенной под SEQ ID NO: 202.

Ковалентные модификации конструкций на основе антител также включены в объем настоящего изобретения и обычно, но не всегда, осуществляются посттрансляционно. Например, некоторые типы ковалентных модификаций конструкции на основе антитела вводят в молекулу путем проведения реакции между специфическими аминокислотными остатками конструкции на основе антитела с органическим дериватизирующим средством, которое способно вступать в реакцию с выбранными боковыми цепями или N- или C-

концевыми остатками.

Цистеинильные остатки чаще всего реагируют с α -галогенацетатами (и соответствующими аминами), такими как хлоруксусная кислота или хлорацетамид, с образованием карбоксиметильных или карбоксиамидометильных производных. Цистеинильные остатки также дериватизируются за счет реакции с бромтрифторацетоном, α -бром- β -(5-имидозоил)пропионовой кислотой, хлорацетилфосфатом, N-алкилмалеимидами, 3-нитро-2-пиридилдисульфидом, метил-2-пиридилдисульфидом, п-хлорртутьбензоатом, 2-хлорртуть-4-нитрофенолом или хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом.

Гистидильные остатки дериватизируются за счет реакции с диэтилпирокарбонатом при pH 5,5-7,0, поскольку это средство является относительно специфическим для гистидильной боковой цепи. Также применимым является пара-бромфенацилбромид; при этом реакцию предпочтительно проводят в 0,1 М какодилате натрия при pH 6,0. Лизинильные и аминоконцевые остатки подвергают реакции с ангидридами янтарной или других карбоновых кислот. Дериватизация этими средствами имеет эффект изменения заряда лизинильных остатков на противоположный. Другие подходящие реагенты для дериватизации остатков, содержащих альфа-аминогруппу, включают сложные имидозфире, такие как метилпиколиминидат; пиридоксальфосфат; пиридоксаль; хлорборогидрид; тринитробензолсульфокислоту; O-метилизомочевину; 2,4-пентандион и глиоксилат в реакции, катализируемой трансаминазой.

Аргинильные остатки модифицируют посредством реакции с одним или несколькими традиционными реагентами, среди которых фенилглиоксаль, 2,3-бутандион, 1,2-циклогександион и нингидрин. Для дериватизации остатков аргинина требуется, чтобы реакцию проводили в щелочных условиях из-за высокого pKa функциональной группы гуанидина. Кроме того, эти реагенты могут реагировать с группами лизина, а также эпсилон-аминогруппой аргинина.

Можно проводить специфическую модификацию тирозильных остатков, при этом особый интерес представляет введение спектральных меток в тирозильные остатки посредством реакции с ароматическими соединениями диазония или с тетранитрометаном. Для образования O-ацетилтирозильных соединений и 3-нитропроизводных чаще всего применяют N-ацетилимидизол и тетранитрометан соответственно. Тирозильные остатки иодируют с применением ^{125}I или ^{131}I , чтобы получить меченые белки для использования в радиоиммуноанализе, при этом подходит описанный выше способ с хлорамином T.

Карбоксильные боковые группы (аспартил или глутамил) селективно модифицируют посредством реакции с карбодиимидами ($\text{R}'\text{-N}=\text{C}=\text{N-R}'$), где R и R' необязательно представляют собой разные алкильные группы, такими как 1-циклогексил-3-(2-морфолинил-4-этил)карбодиимид или 1-этил-3-(4-азония-4,4-диметилпентил)карбодиимид. Кроме того, аспартильные и глутамильные остатки превращают в аспарагинильные и глутаминильные остатки посредством реакции с ионами аммония.

Дериватизация бифункциональными средствами применима для перекрестного сшивания конструкций на основе антител по настоящему изобретению с водонерастворимой опорной матрицей или поверхностью для применения в различных способах. Обычно используемые сшивающие средства включают, например, 1,1-бис(диазоацетил)-2-фенилэтан, глутаральдегид, сложные эфиры N-гидроксисукцинимиды, например, сложные эфиры с 4-азидосалициловой кислотой, сложные гомобифункциональные имидозэфиры, включая сложные дисукцинимидильные эфиры, такие как 3,3'-дитиобис(сукцинимидилпропионат) и бифункциональные малеимиды, такие как бис-N-малеимидо-1,8-октан. Дериватирующие средства, такие как метил-3-[(п-азидофенил)дитио]пропиоимидат, дают фотоактивируемые промежуточные соединения, которые способны образовывать поперечные сшивки в присутствии света. В альтернативном варианте реакционноспособные водонерастворимые матрицы, такие как активируемые бромцианом углеводы, и реакционноспособные субстраты, описанные в патентах США №№ 3969287; 3691016; 4195128; 4247642; 4229537 и 4330440, используются для иммобилизации белка.

Глутаминильные и аспарагинильные остатки часто дезамидируют до соответствующих глутамильных и аспартильных остатков соответственно. В качестве альтернативы эти остатки дезамидируют в умеренно кислотных условиях. Любая форма этих остатков находится в пределах объема настоящего изобретения.

Другие модификации включают гидроксилирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп сериновых или треонинных остатков, метилирование α -аминогрупп боковых цепей лизина, аргинина и гистидина (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86), ацетилирование N-концевого амина и амидирование любой C-концевой карбоксильной группы.

Другой тип ковалентной модификации конструкций на основе антител, включенных в объем настоящего изобретения, предусматривает изменение паттерна гликозилирования белка. Как известно из уровня техники, паттерны гликозилирования могут зависеть как от последовательности белка (например, от присутствия или отсутствия конкретных аминокислотных остатков, связанных с гликозилированием, обсуждаемых ниже), так и от клетки-хозяина или организма-хозяина, в которых продуцируется белок. Конкретные системы экспрессии обсуждаются ниже.

Гликозилирование полипептидов, как правило, является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту за исключением пролина, представляют собой последовательности распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к

присоединению одного из сахаров, N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы, к гидроксиаминокислоте, наиболее часто к серину или треонину, хотя также может применяться 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин.

Добавление сайтов гликозилирования в конструкцию на основе антитела удобно осуществлять путем изменения аминокислотной последовательности так, чтобы она содержала одну или несколько из вышеописанных трипептидных последовательностей (в случае сайтов N-связанного гликозилирования). Изменение также можно осуществлять добавлением одного или нескольких сериновых или треониновых остатков в исходную последовательность или заменой на них (в случае сайтов O-связанного гликозилирования). Для удобства аминокислотную последовательность конструкции на основе антитела предпочтительно изменяют посредством изменений на уровне ДНК, в частности, путем введений мутаций в ДНК, кодирующую полипептид, в предварительно выбранных основаниях, вследствие чего получают кодоны, которые будут транслироваться в требуемые аминокислоты.

Другим средством повышения количества углеводных фрагментов в конструкции на основе антитела является химическое или ферментативное присоединение гликозидов к белку. Эти процедуры являются предпочтительными по той причине, что они не требуют продуцирования белка в клетке-хозяине, которая обладает способностями к гликозилированию для обеспечения N- и O-связанного гликозилирования. В зависимости от используемого вида присоединения сахар(-а) могут быть присоединены к (а) аргинину и гистидину, (б) свободным карбоксильным группам, (с) свободным сульфгидрильным группам, таким как группы цистеина, (d) свободным гидроксильным группам, таким как группы серина, треонина или гидроксипролина, I ароматическим остаткам, таким как остатки фенилаланина, тирозина или триптофана, или (f) амидной группе глутамина. Эти способы описаны в WO 87/05330, и в Aplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306.

Удаление углеводных фрагментов, присутствующих в исходной конструкции на основе антитела, можно осуществлять химическим или ферментативным способом. Химическое дегликозилирование требует воздействия на белок соединением, представляющим собой трифторметансульфоновую кислоту, или эквивалентным соединением. Такая обработка приводит к отщеплению большинства или всех сахаров за исключением связывающего сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), тогда как полипептид остается интактным. Химическое дегликозилирование описано в Hakimuddin *et al.*, 1987, *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52 и в Edge *et al.*, 1981, *Anal. Biochem.* 118:131. Ферментативное расщепление углеводных фрагментов на полипептиды может быть достигнуто путем применения ряда эндо- и экзо-гликозидаз, как описано в Thotakura *et al.*, 1987, *Meth. Enzymol.* 138:350. Гликозилирование в потенциальных сайтах гликозилирования может быть предотвращено путем применения соединения туникамицина, как описано в Duskin *et al.*, 1982, *J. Biol. Chem.* 257:3105. Туникамицин блокирует образование белок-N-гликозидных связей.

Другие модификации конструкции на основе антитела также предусмотрены в данном документе. Например, другой тип ковалентной модификации конструкции на основе антитела предусматривает связывание конструкции на основе антитела с различными небелковыми полимерами, включая без ограничения различные полиолы, такие как полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, полиоксиалкилены или сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, как это представлено в патентах США №№ 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337. Кроме того, как известно из уровня техники, аминокислотные замены можно проводить в различных положениях в пределах конструкции на основе антитела, например, чтобы облегчить добавление полимеров, таких как PEG.

В некоторых вариантах осуществления ковалентная модификация конструкций на основе антител по настоящему изобретению предусматривает добавление одной или нескольких меток. Группу мечения можно присоединять к конструкции на основе антитела с помощью спейсерных плечей различной длины, чтобы уменьшить потенциальное стерическое несоответствие. В данной области техники известны различные способы мечения белков, которые можно применять при осуществлении данного изобретения. Термин "метка" или "группа мечения" относится к любой обнаруживаемой метке. В целом метки делятся на различные классы в зависимости от анализа, в котором они должны обнаруживаться; следующие примеры включают без ограничения:

а) изотопные метки, которые могут представлять собой радиоактивные или тяжелые изотопы, такие как радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I)

б) магнитные метки (например, магнитные частицы);

с) редокс-активные фрагменты;

д) оптические красители (включая без ограничения хромофоры, люминофоры и флуорофоры), такие как флуоресцентные группы (например, FITC, родамин, люминофор на основе комплексов лантанидов), хемилюминесцентные группы и флуорофоры, которые могут представлять собой "низкомолекулярные" флуоресцирующие средства или белковые флуоресцирующие средства;

е) ферментные группы (например, пероксидазу хрена, β -галактозидазу, люциферазу, щелочную фосфатазу);

ф) биотинилированные группы;

г) заранее заданные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновой застёжки, сайты связывания для вторичных антител, домены связывания металлов, эпитопные метки и т. д.).

Под "флуоресцентной меткой" подразумевают любую молекулу, которая может быть обнаружена с помощью присущих ей флуоресцентных свойств. Подходящие флуоресцентные метки включают без ограничения флуоресцеин, родамин, тетраметилродамин, эозин, ~~уорфиллизат~~ эпитрозин, кумарин, метилкумарины, пирен, малахитовый зеленый, стильбен, Lucifer Yellow, Cascade BlueJ, Texas Red, IAEDANS,

EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, Oregon green, красители Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Cascade Blue, Cascade Yellow и R-фикоэритрин (PE) (Molecular Probes, Юджин, Орегон), FITC, родамин и Texas Red (Pierce, Рокфорд, Иллинойс), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Питтсбург, Пенсильвания). Подходящие оптические красители, включая флуорофоры, описаны в Molecular Probes Handbook by Richard P. Haugland.

Подходящие белковые флуоресцентные метки также включают без ограничения зеленый флуоресцентный белок, включая GFP из видов *Renilla*, *Ptilosarcus* или *Aequorea* (Chalfie *et al.*, 1994, *Science* 263:802-805), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., номер доступа в GenBank U55762), синий флуоресцентный белок (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Монреаль, Квебек, Канада H3H 1J9; Stauber, 1998, *Biotechniques* 24:462-471; Heim *et al.*, 1996, *Curr. Biol.* 6:178-182), усиленный желтый флуоресцентный белок (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), люциферазу (Ichiki *et al.*, 1993, *J. Immunol.* 150:5408-5417), β -галактозидазу (Nolan *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2603-2607) и *Renilla* (WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, патенты США №№ 5292658; 5418155; 5683888; 5741668; 5777079; 5804387; 5874304; 5876995; 5925558).

Конструкция на основе антитела по настоящему изобретению также может содержать дополнительные домены, которые, например, способствуют выделению молекулы или связаны с адаптированным фармакокинетическим профилем молекулы. Домены, которые способствуют выделению конструкции на основе антитела, могут быть выбраны из пептидных мотивов или вторично введенных фрагментов, которые могут захватываться в способе выделения, например, колонкой для выделения. Неограничивающие варианты осуществления таких дополнительных доменов включают пептидные мотивы, известные как Мус-метка, НАТ-метка, НА-метка, ТАР-метка, GST-метка, хитинсвязывающий домен (CBD-метка), мальтозасвязывающий домен (MBP-метка), Flag-метка, Strep-метка и ее варианты (например, StrepII-метка) и His-метка. Все конструкции на основе антител, раскрытые в данном документе, характеризующиеся идентифицированными CDR, могут содержать домен His-метки, который обычно известен как повтор последовательных остатков His в аминокислотной последовательности молекулы, предпочтительно из пяти и более предпочтительно из шести остатков His (гексаксистидин). His-метка может быть расположена, например, на N- или C-конце конструкции на основе антитела, предпочтительно она расположена на C-конце. Наиболее предпочтительно гексаксистидиновая метка (HHHHHH) (SEQ ID NO:199) связана посредством пептидной связи с C-концом конструкции на основе антитела в соответствии с настоящим изобретением. Кроме того, с полигистидиновой меткой можно комбинировать конъюгатную систему PLGA-PEG-PLGA для применения, предусматривающего замедленное высвобождение, и для улучшения фармакокинетического профиля.

Также предполагаются модификации аминокислотных последовательностей

конструкций на основе антител, описанных в данном документе. Например, может потребоваться улучшение аффинности связывания и/или других биологических свойств конструкции на основе антитела. Варианты аминокислотных последовательностей конструкций на основе антител получают путем введения соответствующих нуклеотидных замен в нуклеиновую кислоту конструкций на основе антител или путем пептидного синтеза. Все из описанных ниже модификаций аминокислотной последовательности должны приводить к такой конструкции на основе антитела, которая по-прежнему сохраняет требуемую биологическую активность (связывание с поверхностным антигеном клетки-мишени и с CD3) немодифицированной исходной молекулы.

Термины "аминокислота" или "аминокислотный остаток", как правило, относятся к аминокислоте, имеющей принятое в данной области техники определение, такой как аминокислота, выбранная из группы, состоящей из аланина (Ala или A); аргинина (Arg или R); аспарагина (Asn или N); аспарагиновой кислоты (Asp или D); цистеина (Cys или C); глутамина (~~Gln~~Gln или Q); глутаминовой кислоты (~~Glu~~Glu или E); глицина (~~Gly~~Gly или G); гистидина (His или H); изолейцина (Ile или I); лейцина (Leu или L); лизина (Lys или K); метионина (Met или M); фенилаланина (Phe или F); пролина (Pro или P); серина (Ser или S); треонина (Thr или T); триптофана (Trp или W); тирозина (Tyr или Y) и валина (Val или V), хотя при необходимости можно применять модифицированные, синтетические или редкие аминокислоты. Обычно аминокислоты можно разделить на группы, имеющие неполярную боковую цепь (например, Ala, Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Val); отрицательно заряженную боковую цепь (например, Asp, ~~Glu~~Glu); положительно заряженную боковую цепь (например, Arg, His, Lys) или незаряженную полярную боковую цепь (например, Asn, Cys, ~~Gln~~, ~~Gly~~Gln, Gly, His, Met, Phe, Ser, Thr, Trp и Tyr).

Модификации аминокислот включают, например, делеции, и/или вставки, и/или замены остатков в пределах аминокислотных последовательностей конструкций на основе антител. С целью получения конечной конструкции осуществляют любую комбинацию из делеции, вставки и замены, при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками. Изменения аминокислот также могут изменять посттрансляционные процессы, которым подвергаются конструкции на основе антител, такие как изменение количества или положения сайтов гликозилирования.

Например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислот могут быть вставлены, замещены или удалены в каждом из CDR (конечно, в зависимости от их длины), в то же время 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, или 25 аминокислот могут быть вставлены, замещены или удалены в каждом из FR. Предпочтительно вставки в аминокислотную последовательность включают слияния с амино- и/или карбокси-концом, варьирующие по длине в диапазоне от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 остатков до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также вставки из одного или нескольких аминокислотных остатков внутри последовательности. Соответствующие модификации также можно проводить в пределах третьего домена конструкции на основе антитела по настоящему изобретению. Вариант со вставкой конструкции на основе антитела по настоящему

изобретению включает слияние фермента с N-концом или с C-концом конструкции на основе антитела или слияние с полипептидом.

Сайты, представляющие наибольший интерес для мутагенеза с заменой, включают (но без ограничения) CDR тяжелой и/или легкой цепи, в частности, гипервариабельные участки, но также предполагаются изменения FR в тяжелой и/или легкой цепи. Замены предпочтительно представляют собой консервативные замены, описанные в данном документе. В CDR предпочтительно могут быть заменены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, в то же время 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, или 25 аминокислот могут быть заменены в каркасных участках (FR) в зависимости от длины CDR или FR. Например, если последовательность CDR включает в себя 6 аминокислот, подразумевается возможность замены одной, двух или трех из этих аминокислот. Аналогично, если последовательность CDR включает в себя 15 аминокислот, подразумевается возможность замены одной, двух, трех, четырех, пяти или шести из этих аминокислот.

Применимый способ идентификации определенных остатков или участков в конструкциях на основе антител, которые являются предпочтительными местоположениями для мутагенеза, называется "аланин-сканирующий мутагенез", описанный Cunningham and Wells в Science, 244: 1081-1085 (1989). В данном случае идентифицируют остаток или группу остатков-мишеней в пределах конструкции на основе антитела (например, заряженные остатки, такие как Arg, Asp, His, Lys и Glu) и заменяют их нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (наиболее предпочтительно аланином или полиаланином), чтобы повлиять на взаимодействие аминокислот с эпитопом.

Те местоположения аминокислот, которые демонстрируют функциональную чувствительность к заменам, затем уточняют путем введения дополнительных или других вариантов в сайты замен или вместо них. Таким образом, хотя сайт или участок для введения варианта аминокислотной последовательности заранее задан, собственно природа мутации не обязательно должна задаваться заранее. Например, чтобы проанализировать или оптимизировать характеристики мутации в данном сайте, можно провести аланин-сканирующий или случайный мутагенез в кодоне- или участке-мишени и провести скрининг экспрессированных вариантов конструкции на основе антитела в отношении оптимальной комбинации требуемой активности. Хорошо известны методики осуществления мутаций с замещением в заранее заданных сайтах в ДНК с известной последовательностью, например, мутагенез с праймером M13 и ПЦР-мутагенез. Скрининг мутантов проводят с применением анализов антигенсвязывающей активности, такой как связывание поверхностного антигена клетки-мишени или CD3.

Обычно, если аминокислоты заменены в одном или нескольких или во всех CDR тяжелой и/или легкой цепи, то предпочтительно, чтобы полученная таким образом последовательность "с заменами" была на по меньшей мере 60% или 65%, более предпочтительно на 70% или 75%, еще более предпочтительно на 80% или 85% и особенно предпочтительно на 90% или 95% идентична "исходной" последовательности CDR. Это

означает, что степень идентичности с последовательностью "с заменами" зависит от длины CDR. Например, чтобы CDR, содержащий 5 аминокислот, предпочтительно был на 80% идентичен своей последовательности с заменой, должна быть заменена по меньшей мере одна аминокислота. Соответственно, CDR конструкции на основе антитела могут иметь разную степень идентичности со своими последовательностями с заменами, например, CDRL1 может характеризоваться 80%, тогда как CDRL3 может характеризоваться 90%.

Предпочтительные замены (или замещения) представляют собой консервативные замены. Однако предусматривается любая замена (включая неконсервативную замену или одну или несколько из "иллюстративных замен", перечисленных в таблице 3 ниже) при условии, что конструкция на основе антитела сохраняет свою способность к связыванию с поверхностным антигеном клетки-мишени посредством первого домена и, соответственно, с CD3, CD3-эпсилон, посредством второго домена, и/или его CDR характеризуются идентичностью с полученной таким образом последовательностью с заменами (по меньшей мере на 60% или 65%, более предпочтительно на 70% или 75%, еще более предпочтительно на 80% или 85% и особенно предпочтительно на 90% или 95% идентичны "исходной" последовательности CDR).

Консервативные замены приведены в таблице 3 в колонке с заголовком "предпочтительные замены". Если такие замены приводят к изменению биологической активности, тогда можно вводить более существенные изменения, обозначенные в таблице 3 как "иллюстративные замены" или дополнительно описанные ниже со ссылкой на классы аминокислот, и продукты подвергать скринингу в отношении требуемой характеристики.

Таблица 3. Аминокислотные замены

Исходная аминокислота	Иллюстративные замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	val, leu, ile	val
Arg I	lys, gln, asn	lys
Asn (N)	gln, his, asp, lys, arg	gln
Asp (D)	glu, asn	glu
Cys I	ser, ala	ser
Gln (Q)	asn, glu	asn
Glu I	asp, gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	asn, gln, lys, arg	Arg
Ile (I)	leu, val, met, ala, phe	Leu
Leu (L)	норлейцин, ile, val, met, ala	Ile
Lys (K)	arg, gln, asn	Arg
Met (M)	leu, phe, ile	Leu
Phe (F)	leu, val, ile, ala, tyr	Tyr

Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	tyr, phe	Tyr
Tyr (Y)	trp, phe, thr, ser	Phe
Val (V)	ile, leu, met, phe, ala	Leu

Существенные модификации биологических свойств конструкции на основе антитела по настоящему изобретению осуществляют путем выбора замен, значительно отличающихся по своему влиянию на поддержание (а) структуры полипептидного скелета в области замены, например, в виде складчатой структуры или спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности молекулы в сайте-мишени или (с) объема боковой цепи. Встречающиеся в природе остатки подразделяют на группы на основании общих свойств боковых цепей: (1) гидрофобные: норлейцин, met, ala, val, leu, ile; (2) нейтральные гидрофильные: cys, ser, thr, asn, gln; (3) кислотные: asp, glu; (4) основные: his, lys, arg; (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: gly, pro; и (6) ароматические: trp, tyr, phe.

Неконсервативные замены будут включать замену представителя одного из этих классов представителем другого класса. Любой остаток цистеина, не принимающий участия в поддержании надлежащей конформации конструкции на основе антитела, обычно можно заменять серином, чтобы улучшить устойчивость молекулы к окислению и предотвратить аномальное перекрестное сшивание. И наоборот, в антитело можно добавить цистеиновую(-ые) связь(-и) для улучшения его стабильности (в частности, если антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как Fv-фрагмент).

В случае аминокислотных последовательностей идентичность и/или сходство последовательностей определяют с применением стандартных методик, известных из уровня техники, включая без ограничения алгоритм локальной идентичности последовательности по Smith and Waterman, 1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482, алгоритм выравнивания для определения идентичности последовательности по Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443, способ поиска сходства по Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, компьютеризированные реализации данных алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Мэдисон, Висконсин), программу Best Fit sequence, описанную в Devereux *et al.*, 1984, *Nucl. Acid Res.* 12:387-395, предпочтительно с применением стандартных параметров, или посредством просмотра. Предпочтительно процент идентичности рассчитывают с помощью FastDB на основании следующих параметров: штраф за несовпадение 1; штраф за введение гэпа 1; штраф за длину гэпа 0,33 и штраф за связывание 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

Примером применимого алгоритма является PILEUP. PILEUP создает

множественное выравнивание последовательностей на основании группы родственных последовательностей с применением последовательных попарных выравниваний. Он также может построить дерево, показывающее кластеризационные взаимосвязи, используемые для создания выравнивания. PILEUP использует упрощение способа последовательного выравнивания Feng & Doolittle, 1987, *J. Mol. Evol.* 35:351-360; способ подобен тому, который описан в Higgins and Sharp, 1989, *CABIOS* 5:151-153. Применимые параметры PILEUP включают стандартный штраф за введение гэпа 3,00, стандартный штраф за удлинение гэпа 0,10 и оцениваемые концевые гэпы.

Другим примером применимого алгоритма является алгоритм BLAST, описанный в: Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Altschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; и Karin *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:5873-5787. Особенно применимой программой BLAST является программа WU-BLAST-2, которая была создана Altschul *et al.*, 1996, *Methods in Enzymology* 266:460-480. В WU-BLAST-2 используются несколько параметров поиска, для большинства из которых установлены стандартные значения. Регулируемые параметры устанавливаются со следующими значениями: длина перекрытия=1, доля перекрытия=0,125, пороговая длина слова (T)= II. Параметры HSP S и HSP S2 являются динамическими значениями и устанавливаются самой программой в зависимости от состава конкретной последовательности и состава конкретной базы данных, по которой проводится поиск представляющей интерес последовательности; при этом данные значения могут регулироваться для повышения чувствительности.

Дополнительным применимым алгоритмом является BLAST с введением гэпов, сообщаемый в Altschul *et al.*, 1993, *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402. В BLAST с введением гэпов используются показатели замены из BLOSUM-62; пороговый параметр T установлен на 9; метод двух хитов для запуска удлинений без введения гэпов задает удлинению гэпа k значение $10+k$; X_u установлен на 16, и X_g установлен на 40 для стадии поиска в базе данных и 67 для завершающей стадии алгоритмов. Выравнивания с гэпами запускаются с помощью показателя, соответствующего приблизительно 22 битам.

В целом гомология, сходство или идентичность аминокислотных последовательностей у отдельных вариантов CDR или последовательностей VH/VL составляют по меньшей мере 60% с последовательностями, приведенными в данном документе, и более типично они характеризуются предпочтительно еще большей гомологией или идентичностью, составляющими по меньшей мере 65% или 70%, более предпочтительно по меньшей мере 75% или 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, и почти 100%. Аналогичным образом "процент (%)" идентичности последовательности нуклеиновой кислоты" относительно последовательности нуклеиновой кислоты у связывающих белков, идентифицированных в данном документе, определяется как процент нуклеотидных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны с нуклеотидными остатками в кодирующей последовательности конструкции на основе антитела. В специальном способе используется модуль BLASTN из WU-BLAST-2 с установленными стандартными

параметрами, с длиной перекрытия и долей перекрытия, установленными на 1 и 0,125 соответственно.

Как правило, гомология, сходство или идентичность последовательностей нуклеиновых кислот между нуклеотидными последовательностями, кодирующими отдельные варианты CDR или последовательности VH/VL, и нуклеотидными последовательностями, приведенными в данном документе, составляет по меньшей мере 60%, и более типично они характеризуются предпочтительно еще большей гомологией или идентичностью, составляющими по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99%, и почти 100%. Таким образом, "вариант CDR" или "вариант участка VH/VL" представляет собой вариант с указанной гомологией, сходством или идентичностью с исходными CDR/VH/VL по настоящему изобретению, и он характеризуется общей биологической функцией, включая без ограничения по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% специфичности и/или активности исходных CDR или VH/VL.

В одном варианте осуществления изобретения процент идентичности конструкций на основе антител в соответствии с настоящим изобретением с последовательностями зародышевой линии человека составляет $\geq 70\%$ или $\geq 75\%$, более предпочтительно $\geq 80\%$ или $\geq 85\%$, даже более предпочтительно $\geq 90\%$ и наиболее предпочтительно $\geq 91\%$, $\geq 92\%$, $\geq 93\%$, $\geq 94\%$, $\geq 95\%$ или даже $\geq 96\%$. Считается, что идентичность с продуктами генов антитела зародышевой линии человека является важным фактором для снижения риска того, что терапевтические белки будут вызывать иммунный ответ против лекарственного препарата у пациента во время лечения. Hwang & Foote ("Immunogenicity of engineered antibodies"; Methods 36 (2005) 3-10) демонстрируют, что уменьшение частей, не являющихся человеческими, в конструкциях на основе антител, представляющих собой лекарственные средства, приводит к снижению риска индукции антител к лекарственным средствам у пациентов во время лечения. Путем сравнения достаточного количества клинически оцененных лекарственных средств на основе антител и соответствующих данных по иммуногенности была показана тенденция, что гуманизация V-участков антител делает белки менее иммуногенными (в среднем у 5,1% пациента), чем антитела, несущие неизмененные V-участки, не являющиеся человеческими (в среднем у 23,59% пациента). Следовательно, для белковых терапевтических средств на основе V-участка в форме конструкций на основе антител необходима большая степень идентичности с человеческими последовательностями. Чтобы определить идентичность с зародышевой линией, V-участки VL можно выравнивать с аминокислотными последовательностями V-сегментов и J-сегментов зародышевой линии человека (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) с применением программного обеспечения Vector NTI и рассчитывать показатель в процентах для аминокислотной последовательности посредством деления идентичных аминокислотных остатков на общее число аминокислотных остатков VL. То же самое можно осуществлять для VH-сегментов (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) за исключением

того, что CDR3 VH может быть исключена вследствие высокой степени ее разнообразия и отсутствия в настоящее время партнеров по выравниванию среди CDR3 VH зародышевой линии человека. Затем можно применять рекомбинантные методики для повышения идентичности последовательностей с генами антител зародышевой линии человека.

В дополнительном варианте осуществления для конструкций на основе биспецифических антител по настоящему изобретению показаны высокие выходы мономеров в стандартных условиях исследовательского масштаба, например, в стандартном двухстадийном способе очистки. Предпочтительно выход мономеров конструкций на основе антител в соответствии с настоящим изобретением составляет $\geq 0,25$ мг/л супернатанта, более предпочтительно $\geq 0,5$ мг/л, даже более предпочтительно ≥ 1 мг/л и наиболее предпочтительно ≥ 3 мг/л супернатанта.

Аналогично можно определять выход димерных изоформ конструкции на основе антитела и, следовательно, процентную долю мономера (то есть мономер: (мономер+димер)) конструкций на основе антител. Показатели продуктивности с учетом мономерных и димерных конструкций на основе антител и рассчитанная процентная доля мономеров, например, могут быть получены на стадии очистки супернатанта культуры с помощью SEC при стандартизированном получении в исследовательских масштабах в роллерных флаконах. В одном варианте осуществления процентная доля мономеров конструкций на основе антител составляет $\geq 80\%$, более предпочтительно $\geq 85\%$, даже более предпочтительно $\geq 90\%$ и наиболее предпочтительно $\geq 95\%$.

В одном варианте реализации изобретения конструкции на основе антитела предпочтительно характеризуются стабильностью в плазме крови (соотношением EC50 с плазмой крови и EC50 без плазмы крови), составляющей ≤ 5 или ≤ 4 , более предпочтительно $\leq 3,5$ или ≤ 3 , даже более предпочтительно $\leq 2,5$ или ≤ 2 и наиболее предпочтительно $\leq 1,5$ или ≤ 1 . Стабильность в плазме крови конструкции на основе антитела может быть проверена путем инкубации конструкции в плазме крови человека при 37°C в течение 24 часов с последующим определением EC50 в анализе цитотоксичности с высвобождением хрома⁵¹. Эффекторные клетки в анализе цитотоксичности могут представлять собой стимулированные обогащенные человеческие CD8-положительные Т-клетки. Клетками-мишенями могут быть, например, клетки СНО, трансфицированные поверхностным антигеном клетки-мишени человека. Соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней (Е:Т) может быть выбрано как 10:1. Применяемый в этих целях пул человеческой плазмы крови получают из крови здоровых доноров, собранной в покрытые EDTA шприцы. Клеточные компоненты удаляют путем центрифугирования, а верхнюю фазу в виде плазмы крови собирают и после этого объединяют. В качестве контроля конструкции на основе антитела разводят непосредственно перед анализом цитотоксичности в среде RPMI-1640. Стабильность в плазме крови рассчитывают как соотношение EC50 (после инкубации плазмы крови) и EC50 (контроля).

Также предпочтительно, чтобы преобразование мономеров в димеры конструкций на основе антител было низким. Степень преобразования можно определять в разных

условиях и анализировать с помощью высокоэффективной эксклюзионной хроматографии. Например, инкубацию мономерных изоформ конструкций на основе антител можно проводить в течение 7 дней при 37°C и концентрациях, например, 100 мкг/мл или 250 мкг/мл в инкубаторе. При таких условиях предпочтительно, чтобы конструкции на основе антител по настоящему изобретению демонстрировали процентную долю димеров $\leq 5\%$, более предпочтительно $\leq 4\%$, даже более предпочтительно $\leq 3\%$, даже более предпочтительно $\leq 2,5\%$, даже более предпочтительно $\leq 2\%$, даже более предпочтительно $\leq 1,5\%$ и наиболее предпочтительно $\leq 1\%$, или $\leq 0,5\%$, или даже 0%.

Также предпочтительно, чтобы конструкции на основе биспецифических антител по настоящему изобретению характеризовались низким уровнем преобразования в димеры после нескольких циклов замораживания/размораживания. Например, мономер конструкции на основе антитела доводят до концентрации 250 мкг/мл, например, в типичном буфере для составления и подвергают трем циклам замораживания/размораживания (замораживание при -80°C в течение 30 мин с последующим размораживанием в течение 30 мин при комнатной температуре) с последующей высокоэффективной SEC для определения процентной доли исходно мономерной конструкции на основе антитела, которая была преобразована в димерную конструкцию на основе антитела. Предпочтительно процентная доля димеров конструкций на основе биспецифических антител составляет $\leq 5\%$, более предпочтительно $\leq 4\%$, даже более предпочтительно $\leq 3\%$, даже более предпочтительно $\leq 2,5\%$, даже более предпочтительно $\leq 2\%$, даже более предпочтительно $\leq 1,5\%$ и наиболее предпочтительно $\leq 1\%$ или даже $\leq 0,5\%$, например, после трех циклов замораживания/размораживания.

Предпочтительно конструкции на основе биспецифических антител по настоящему изобретению демонстрируют хорошую термостабильность при температуре агрегации $\geq 45^\circ\text{C}$ или $\geq 50^\circ\text{C}$, более предпочтительно $\geq 52^\circ\text{C}$ или $\geq 54^\circ\text{C}$, даже более предпочтительно $\geq 56^\circ\text{C}$ или $\geq 57^\circ\text{C}$ и наиболее предпочтительно $\geq 58^\circ\text{C}$ или $\geq 59^\circ\text{C}$. Параметр термостабильности, выраженный как температура агрегации антитела, можно определять следующим образом. Раствор антитела в концентрации 250 мкг/мл переносят в одноразовую кювету и помещают в устройство для исследования методом динамического рассеяния света (DLS). Образец нагревают от 40°C до 70°C при скорости нагревания 0,5°C/мин при постоянном сборе данных для определяемого радиуса. Увеличение радиуса, указывающее на плавление и агрегацию белка, используют для расчета температуры агрегации антитела.

В альтернативном варианте температурные кривые плавления можно определить методом дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) для определения характеристичной биофизической стабильности белка конструкций антител. Эти эксперименты проводят с применением устройства для VP-DSC MicroCal LLC (Нортхемптон, Массачусетс, США). Поглощение энергии образцом, содержащим конструкцию на основе антитела, регистрируют в диапазоне от 20°C до 90°C и сравнивают с образцом, содержащим только буфер для составления. Конструкции на основе антител

доводили до конечной концентрации 250 мкг/мл, например, в SEC подвижном буфере. Для получения соответствующей кривой плавления общую температуру образца повышают поэтапно. При каждой температуре Т регистрируют поглощение энергии образца и эталоны в виде буфера для составления. Разницу поглощения энергии C_p (ккал/моль/°С) образца минус эталон наносят на график как зависимость от соответствующей температуры. Температуру плавления определяют как температуру при первом максимуме поглощения энергии.

Также предполагается, что конструкции на основе биспецифических антител к поверхностному антигену клетки-мишени x CD3 по настоящему изобретению характеризуются непрозрачностью (измеряемой при OD340 после концентрирования очищенной мономерной конструкции на основе антитела до 2,5 мг/мл и инкубации в течение ночи), составляющей $\leq 0,2$, предпочтительно $\leq 0,15$, более предпочтительно $\leq 0,12$, еще более предпочтительно $\leq 0,1$ и наиболее предпочтительно $\leq 0,08$.

В дополнительном варианте осуществления конструкция на основе антитела в соответствии с настоящим изобретением является стабильной при физиологическом или немного более низком значении pH, т. е. pH от приблизительно 7,4 до 6,0. Чем более вынослива конструкция на основе антитела при отличном от физиологического pH, таком как pH 6,0, тем выше степень извлечения конструкции на основе антитела, элюируемой из ионообменной колонки, относительно общего количества загруженного белка. Извлечение конструкции на основе антитела из ионообменной (например, катионообменной) колонки при pH приблизительно 6,0 составляет предпочтительно $\geq 30\%$, более предпочтительно $\geq 40\%$, более предпочтительно $\geq 50\%$, еще более предпочтительно $\geq 60\%$, еще более предпочтительно $\geq 70\%$, еще более предпочтительно $\geq 80\%$, еще более предпочтительно $\geq 90\%$, еще более предпочтительно $\geq 95\%$ и наиболее предпочтительно $\geq 99\%$.

Дополнительно подразумевается, что конструкции на основе биспецифических антител по настоящему изобретению демонстрируют терапевтическую эффективность или противоопухолевую активность. Это можно оценить, например, в исследовании, раскрытом в следующем примере, на модели с ксенотрансплантатом опухоли человека на поздней стадии.

Специалисту в данной области известно, как модифицировать или адаптировать определенные параметры этого исследования, такие как количество инъецируемых опухолевых клеток, место инъекции, количество трансплантируемых Т-клеток человека, количество конструкций на основе биспецифических антител, подлежащих введению, и график введения, с получением при этом значимого и воспроизводимого результата. Предпочтительно ингибирование роста опухоли Т/С [%] составляет ≤ 70 или ≤ 60 , более предпочтительно ≤ 50 или ≤ 40 , даже более предпочтительно ≤ 30 или ≤ 20 и наиболее предпочтительно ≤ 10 , или ≤ 5 , или даже $\leq 2,5$.

В предпочтительном варианте осуществления конструкции на основе антитела по настоящему изобретению конструкция на основе антитела представляет собой конструкцию на основе одноцепочечного антитела.

Также в предпочтительном варианте осуществления конструкции на основе антитела по настоящему изобретению указанный третий домен содержит в направлении от аминоконца к карбоксильному концу:

шарнирный участок-CH2-CH3-линкер-шарнирный участок-CH2-CH3.

Также в одном варианте осуществления настоящего изобретения домен CH2 одного или предпочтительно каждого (обоих) полипептидных мономеров третьего домена содержит внутридоменный цистеиновый дисульфидный мостик. Как известно в данной области техники, термин "цистеиновый дисульфидный мостик" относится к функциональной группе с общей структурой *R-S-S-R*. Данная связь также называется SS-связью или дисульфидным мостиком и получена путем соединения двух тиоловых групп остатков цистеина. В случае конструкции на основе антитела по настоящему изобретению особенно предпочтительно, чтобы цистеины, образующие цистеиновый дисульфидный мостик в зрелой конструкции на основе антитела, были введены в аминокислотную последовательность домена CH2, в соответствующие положения 309 и 321 (нумерация по Kabat).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения удален сайт гликозилирования домена CH2 в положении 314 по Kabat. Предпочтительно, чтобы данное удаление сайта гликозилирования достигалось путем замены N314X, где X представляет собой любую аминокислоту, кроме Q. Указанная замена предпочтительно представляет собой замену N314G. В более предпочтительном варианте осуществления указанный домен CH2 дополнительно содержит следующие замены (положения в соответствии с Kabat): V321C и R309C (эти замены вводят внутридоменный цистеиновый дисульфидный мостик в положения 309 и 321 по Kabat).

Предполагается, что предпочтительные признаки конструкции на основе антитела по настоящему изобретению в сравнении, например, с конструкцией на основе биспецифического антитела с гетеро-Fc, известной из уровня техники (фигура 1b), помимо прочего, могут быть связаны с введением вышеописанных модификаций в домен CH2. Таким образом, для конструкции по настоящему изобретению предпочтительно, чтобы домены CH2 в третьем домене конструкции на основе антитела по настоящему изобретению содержали внутридоменный цистеиновый дисульфидный мостик в положениях 309 и 321 по Kabat, и/или сайт гликозилирования в положении 314 по Kabat был удален с помощью замены N314X, приведенной выше, предпочтительно путем замены N314G.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения домены CH2 в третьем домене конструкции на основе антитела по настоящему изобретению содержат внутридоменный цистеиновый дисульфидный мостик в положениях 309 и 321 по Kabat, а сайт гликозилирования в положении 314 по Kabat удален с помощью замены N314G.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрена конструкция на основе антитела, в которой:

(182i) первый домен содержит два переменных домена антитела, и второй домен содержит два переменных домена антитела;

(ii) первый домен содержит один переменный домен антитела, и второй домен содержит два переменных домена антитела;

(iii) первый домен содержит два переменных домена антитела, и второй домен содержит один переменный домен антитела; или

(iv) первый домен содержит один переменный домен антитела, и второй домен содержит один переменный домен антитела.

Соответственно, первый и второй домены могут представлять собой связывающие домены, каждый из которых содержит два переменных домена антитела, таких как домены VH и VL. Примеры таких связывающих доменов, содержащих два переменных домена антитела, были описаны выше в данном документе и включают, например, Fv-фрагменты, scFv-фрагменты или Fab-фрагменты, описанные выше в данном документе. В качестве альтернативы либо один, либо оба этих связывающих домена могут содержать только единственный переменный домен. Примеры таких однодоменных связывающих доменов описаны в данном документе выше и включают, например, нанотела или антитела с единственным переменным доменом, содержащие только один переменный домен, который может представлять собой VHH, VH или VL, которые специфически связывают антиген или эпитоп независимо от других V-участков или доменов.

В предпочтительном варианте осуществления конструкции на основе антитела по настоящему изобретению первый и второй домены слиты с третьим доменом посредством пептидного линкера. Предпочтительный пептидный линкер был описан в данном документе выше и характеризуется аминокислотной последовательностью Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, т. е. Gly₄Ser (SEQ ID NO: 187), или ее полимерами, т. е. (Gly₄Ser)_x, где x составляет целое число 1 или более (например, 2 или 3). Особенно предпочтительный линкер для слияния первого и второго доменов с третьим доменом приведен под SEQ ID NO: 1.

В предпочтительном варианте осуществления конструкция на основе антитела по настоящему изобретению характеризуется тем, что она содержит в направлении от аминоконца к карбоксильному концу:

(a) первый домен;

(b) пептидный линкер с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 187-189;

I второй домен;

(d) пептидный линкер с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 187, 188, 189, 195, 196, 197 и 198;

I первый полипептидный мономер третьего домена;

(f) пептидный линкер с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 191, 192, 193 и 194; и

(g) второй полипептидный мономер третьего домена.

В одном аспекте настоящего изобретения поверхностный антиген клетки-мишени,

который связывается первым доменом, представляет собой опухолевый антиген, специфический антиген иммунологического нарушения или вирусный антиген. Под применяемым в данном документе термином "опухолевый антиген" можно понимать те антигены, которые представлены на клетках опухоли. Эти антигены могут быть представлены на поверхности клетки внеклеточной частью, которая часто объединена с трансмембранной и цитоплазматической частью молекулы. Иногда эти антигены могут быть представлены только на опухолевых клетках, но никогда не представлены на нормальных клетках. Опухолевые антигены могут экспрессироваться исключительно на опухолевых клетках или могут представлять собой специфическую для опухоли мутацию по сравнению с нормальными клетками. В этом случае их называют опухолеспецифическими антигенами. Более распространенными являются антигены, которые представлены на опухолевых клетках и нормальных клетках, и их называют опухолеассоциированными антигенами. Эти опухолеассоциированные антигены могут быть сверхэкспрессированы по сравнению с нормальными клетками, или они доступны для связывания антителом на опухолевых клетках вследствие менее компактной структуры опухолевой ткани по сравнению с нормальной тканью. Неограничивающими примерами применяемых в данном документе опухолевых антигенов являются CDH19, MSLN, DLL3, FLT3, EGFRvIII, CD33, CD19, CD20, CD70, BCMA и PSMA.

Дополнительные поверхностные антигены клетки-мишени, специфические для иммунологического нарушения в контексте настоящего изобретения, включают, например, TL1A и TNF-альфа. На указанные мишени предпочтительно направлена конструкция на основе биспецифического антитела по настоящему изобретению, которое предпочтительно представляет собой полноразмерное антитело. В очень предпочтительном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой гетероантитело IgG.

В предпочтительном варианте осуществления конструкции на основе антитела по настоящему изобретению опухолевый антиген выбран из группы, состоящей из CDH19, MSLN, DLL3, FLT3, EGFRvIII, CD33, CD19, CD20, CD70, BCMA и PSMA.

В одном аспекте настоящего изобретения конструкция на основе антитела содержит в направлении от аминоконца к карбоксильному концу:

(a) первый домен с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 8, 17, 27, 28, 37, 38, 39, 40, 41, 48, 49, 50, 51, 52, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 89, 90, 91, 92, 93, 100, 101, 102, 103, 104, 113, 114, 121, 122, 123, 124, 125, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181

(b) пептидный линкер с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 187-189;

I второй домен с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из ~~SEQ ID NO: 187-189~~ SEQ ID NO: 23, 25, 41, 43, 59, 61, 77, 79, 95, 97, 113, 115, 131, 133, 149, 151, 167, 169, 185 или 187 в WO 2008/119567 или приведенной под SEQ ID NO: 202;

(d) пептидный линкер с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 187, 188, 189, 195, 196, 197 и 198;

I первый полипептидный мономер третьего домена с полипептидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17-24 в WO2017/134140;

(f) пептидный линкер с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 191, 192, 193 и 194; и

(g) второй полипептидный мономер третьего домена с полипептидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17-24 в WO2017/134140 .

В одном аспекте конструкция на основе биспецифического антитела по настоящему изобретению характеризуется наличием аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из следующего, и направленной на соответствующий поверхностный антиген клетки-мишени:

(a) SEQ ID NO: 27, 28, 37-41; CD33;

(b) каждой из SEQ ID NO: 48-52; EGFRvIII;

(c) каждой из SEQ ID NO: 59-64; MSLN;

(d) каждой из SEQ ID NO: 71-82; CDH19;

(e) каждой из SEQ ID NO: 100-104; DLL3;

(f) SEQ ID NO: 7, 8, 17, 113 и 114; CD19;

(g) каждой из SEQ ID NO: 89-93; FLT3;

(h) каждой из SEQ ID NO: 121-125; CDH3;

(i) каждой из SEQ ID NO: 132-136; BCMA; и

(j) каждой из SEQ ID NO: 143-151, 158-166 и 173-181; PSMA.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены полинуклеотид/молекула нуклеиновой кислоты, кодирующие конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению. Полинуклеотид представляет собой биополимер, состоящий из 13 или более нуклеотидных мономеров, ковалентно связанных в цепь. ДНК (такая как кДНК) и РНК (такая как мРНК) представляют собой примеры полинуклеотидов с разной биологической функцией. Нуклеотиды представляют собой органические молекулы, служащие в качестве мономеров или субъединиц молекул нуклеиновых кислот, таких как ДНК или РНК. Молекула нуклеиновой кислоты или полинуклеотид могут быть двухнитевыми или однонитевыми, линейными или кольцевыми. Предпочтительно она содержится в векторе, который предпочтительно находится в клетке-хозяине. Указанная клетка-хозяин, например, после трансформации или трансфекции вектором или полинуклеотидом по настоящему изобретению, способна к экспрессии конструкции на основе антитела. Для этой цели полинуклеотид или молекула нуклеиновой кислоты функционально связаны с регуляторными последовательностями.

Генетический код представляет собой набор правил, согласно которым информация, закодированная в генетическом материале (нуклеиновых кислотах), транслируется в белки.

Биологическое декодирование в живых клетках осуществляется рибосомой, которая связывает аминокислоты в порядке, определяемом мРНК, используя молекулы тРНК для переноса аминокислот и для единовременного считывания трех нуклеотидов мРНК. Код определяет, каким образом последовательности этих нуклеотидных триплетов, называемых кодонами, определяют, какая аминокислота будет добавляться следующей во время синтеза белка. За некоторыми исключениями тринуклеотидный кодон в последовательности нуклеиновой кислоты определяет одну аминокислоту. Поскольку подавляющее большинство генов кодируется абсолютно одинаковым кодом, этот конкретный код часто называют каноническим или стандартным генетическим кодом. Хотя генетический код определяет белковую последовательность для данной кодирующей области, другие геномные участки могут влиять на то, когда и где продуцируются эти белки.

Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотид/молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Вектор представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, применяемую в качестве среды-носителя для переноса (чужеродного) генетического материала в клетку. Термин "вектор" охватывает плазмиды, вирусы, космиды и искусственные хромосомы, но не ограничивается ими. Обычно сконструированные векторы содержат точку начала репликации, сайт множественного клонирования и селективируемый маркер. Собственно вектор обычно представляет собой нуклеотидную последовательность, традиционно последовательность ДНК, содержащую вставку (трансген) и более крупную последовательность, которая служит в качестве "скелета" вектора. Современные векторы могут включать дополнительные элементы помимо вставки-трансгена и скелета: промотор, генетический маркер, ген устойчивости к антибиотикам, репортерный ген, нацеливающую последовательность, метку для очистки белка. Векторы, называемые экспрессионными векторами (экспрессионными конструкциями), специально предназначены для экспрессии трансгена в клетке-мишени и обычно содержат регуляторные последовательности.

Термин "регуляторные последовательности" относится к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. Например, регуляторные последовательности, которые подходят для прокариот, включают промотор, необязательно операторную последовательность и сайт связывания рибосом. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

Нуклеиновая кислота является "функционально связанной", если она размещена в функциональной взаимосвязи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, ДНК, кодирующая предпоследовательность или лидерную последовательность для секреции, функционально связана с ДНК, кодирующей полипептид, если она экспрессируется в виде белка-предшественника, участвующего в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связаны с кодирующей последовательностью, если они влияют на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосом

функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен таким образом, чтобы содействовать трансляции. В целом "функционально связанные" означает, что связанные последовательности ДНК являются смежными, а в случае лидерной последовательности для секреции являются смежными и находятся в рамке считывания. При этом энхансеры не должны быть смежными. Связывание осуществляется путем лигирования в подходящие сайты рестрикции. Если такие сайты не существуют, в соответствии с традиционной практикой используют синтетические олигонуклеотидные адапторы или линкеры.

"Трансфекция" представляет собой способ преднамеренного введения молекул нуклеиновой кислоты или полинуклеотидов (в том числе векторов) в клетки-мишени. Этот термин используется в основном для обозначения невирусных способов для эукариотических клеток. Трансдукция часто используется для описания опосредованного вирусом переноса молекул нуклеиновых кислот или полинуклеотидов. Трансфекция клеток животных, как правило, включает открытие временных пор или "отверстий" в клеточной мембране, чтобы обеспечить поглощение материала. Трансфекцию можно проводить с помощью фосфата кальция, путем электропорации, путем сжатия клеток или путем смешивания катионного липида с материалом для получения липосом, которые сливаются с клеточной мембраной и откладывают свой груз внутри.

Термин "трансформация" применяется для описания невирусного переноса молекул нуклеиновой кислоты или полинуклеотидов (включая векторы) в бактерии, а также в эукариотические клетки, не являющиеся животными, включая клетки растений. Следовательно, трансформация представляет собой генетическое изменение бактериальной или эукариотической клетки, не являющейся животной, в результате прямого поглощения через клеточную(-ые) мембрану(-ы) из окружающей среды и последующее включение экзогенного генетического материала (молекул нуклеиновых кислот). Трансформацию можно осуществлять с помощью искусственных средств. Для того, чтобы произошла трансформация, клетки или бактерии должны находиться в состоянии компетентности, которое может наступать в виде ограниченного во времени ответа на внешние условия, такие как голодание и плотность клеток.

Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрена клетка-хозяин, трансформированная или трансфицированная полинуклеотидом/молекулой нуклеиновой кислоты или вектором по настоящему изобретению. Предполагается, что применяемые в данном документе термины "клетка-хозяин" или "клетка-реципиент" включают любую отдельную клетку или культуру клеток, которые могут быть или были реципиентами векторов, молекул экзогенной нуклеиновой кислоты и полинуклеотидов, кодирующих конструкцию на основе антигена по настоящему изобретению; и/или реципиентами конструкции на основе антигена самой по себе. Введение соответствующего материала в клетку проводят путем трансформации, трансфекции и т. д. Также предполагается, что термин "клетка-хозяин" включает потомство или потенциальное потомство одной клетки. Поскольку в последующих поколениях могут происходить определенные модификации

вследствие естественного, случайного или преднамеренного введения мутаций или вследствие влияния со стороны окружающей среды, такое потомство в действительности может быть не полностью идентичным (по морфологии или по геномной или полному комплексу ДНК) исходной клетке, но по-прежнему включаться в объем термина, применяемого в данном документе. Подходящие клетки-хозяева включают прокариотические или эукариотические клетки и также включают без ограничения бактерии, клетки дрожжей, клетки грибов, клетки растений и клетки животных, такие как клетки насекомых и клетки млекопитающих, например, мыши, крысы, макака или человека.

Конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению можно получать в бактериях. После экспрессии конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению выделяют из клеточной массы *E. coli* в растворимой фракции, и ее можно очищать посредством, например, аффинной и/или эксклюзионной хроматографии. Завершающую очистку можно проводить аналогично способу очистки антитела, экспрессируемого, например, в клетках СНО.

Кроме прокариот, подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии конструкции на основе антитела по настоящему изобретению являются эукариотические микроорганизмы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи. Среди низших эукариотических микроорганизмов-хозяев наиболее часто применяются *Saccharomyces cerevisiae*, или обычные пекарские дрожжи. Однако широкодоступными и применимыми в данном документе являются многие другие роды, виды и штаммы, такие как *Schizosaccharomyces pombe*, хозяева из рода *Kluyveromyces*, такие как *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilae* (ATCC 36906), *K. thermotolerans* и *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402 226); *Pichia pastoris* (EP 183 070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244 234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, такие как *Schwanniomyces occidentalis*; и мицелиальные грибы, такие как *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, и хозяева из рода *Aspergillus*, такие как *A. nidulans* и *A. niger*.

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированной конструкции на основе антитела по настоящему изобретению получены из многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных организмов включают клетки растений и насекомых. Были идентифицированы множество штаммов и вариантов бакуловирусов и соответствующие перmissive клетки-хозяева от таких насекомых-хозяев, как *Spodoptera frugiperda* (гусеница), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодовая мушка) и *Bombyx mori*. Общеизвестными являются различные штаммы вирусов для трансфекции, например, вариант L-1 NPV *Autographa californica* и штамм Bm-5 NPV *Bombyx mori*, и такие вирусы можно применять в данном документе в качестве вируса в соответствии с настоящим изобретением, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

Культуры клеток растений из хлопчатника, кукурузы, картофеля, сои, петунии, томата, арабидопсиса и табака также можно использовать в качестве хозяев. Клонированные

и экспрессионные векторы, применимые для получения белков в культуре клеток растений, известны специалистам в данной области техники. См., например, Hiatt *et al.*, Nature (1989) 342: 76-78, Owen *et al.* (1992) Bio/Technology 10: 790-794, Artsaenko *et al.* (1995) The Plant J 8: 745-750, и Fecker *et al.* (1996) Plant Mol Biol 32: 979-986.

Однако наибольший интерес представляли клетки позвоночных животных, и размножение клеток позвоночных животных в культуре (культуре тканей) стало обычной процедурой. Примерами применимых линий клеток-хозяев, представляющих собой клетки млекопитающих, являются линия клеток почки обезьяны CV1, трансформированная с помощью SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линия клеток эмбриональной почки человека (293 или клетки 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); клетки почки новорожденного хомяка (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомячка/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1, ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крысы линии Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, 1413 8065); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL5 1); клетки TRI (Mather *et al.*, Annals N. Y Acad. Sci. (1982) 383: 44-68); клетки MRC 5; клетки FS4 и линия гепатомы человека (Hep G2).

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен способ получения конструкции на основе антитела по настоящему изобретению, причем указанный способ включает культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в условиях, обеспечивающих экспрессию конструкции на основе антитела по настоящему изобретению, и выделение полученной конструкции на основе антитела из культуры.

Используемый в данном документе термин "культивирование" относится к поддержанию, дифференцировке, росту, пролиферации и/или размножению клеток *in vitro* в подходящих условиях в среде. Термин "экспрессия" включает любую стадию, участвующую в получении конструкции на основе антитела по настоящему изобретению, в том числе без ограничения транскрипцию, посттранскрипционную модификацию, трансляцию, посттрансляционную модификацию и секрецию.

При применении рекомбинантных методик конструкцию на основе антитела можно получать внутри клетки, в периплазматическом пространстве, или она может секретироваться непосредственно в среду. Если конструкцию на основе антитела получают внутри клетки, то на первой стадии дебрис в форме частиц, представляющий собой либо клетки-хозяева, либо лизированные фрагменты, удаляют, например путем центрифугирования или ультрафильтрации. В Carter *et al.*, Bio/Technology 10: 163-167 (1992) описана процедура выделения антител, которые секретируются в периплазматическое пространство *E. coli*. Вкратце, клеточную массу размораживают в присутствии ацетата натрия (pH 3,5), EDTA и фенилметилсульфонилфторида (PMSF) в

течение приблизительно 30 мин. Клеточный дебрис можно удалить путем центрифугирования. Если антитело секретируется в среду, надосадочную жидкость из таких систем экспрессии обычно вначале концентрируют с применением коммерчески доступного фильтра для концентрирования белков, например, ультрафильтрационной установки Amicon или Millipore Pellicon. На любой из предыдущих стадий может быть включен ингибитор протеаз, такой как PMSF, для ингибирования протеолиза, и могут быть включены антибиотики для предотвращения роста случайно занесенных загрязнителей.

Конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению, полученную из клеток-хозяев, можно выделять или очищать, например, с применением хроматографии на гидроксилapatите, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии. Также доступны другие методики очистки белков, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, HPLC с обращенной фазой, хроматография на силикагеле, хроматография на гепарин-SEPHAROSE™, хроматография на анионообменной или катионообменной смоле (как например, в колонке с полиаспарагиновой кислотой), ~~уорфилл-фокусирование~~хроматофокусирование, SDS-PAGE и осаждение сульфатом аммония в зависимости от антитела, которое необходимо извлечь. Если конструкция на основе антитела по настоящему изобретению содержит домен CH3, смола Bakerbond ABX (J.T. Baker, Филлипсберг, Нью-Джерси) является применимой для ее очистки.

Аффинная хроматография является предпочтительной методикой очистки. Матрица, к которой присоединяют аффинный лиганд, наиболее часто представляет собой агарозой, но также доступны другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемым размером пор или поли(стиролдивинил)бензол, обеспечивают более высокие скорости потока и меньшее время обработки, чем те, которые можно достичь с агарозой.

Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению или конструкцию на основе антитела, полученную в соответствии со способом по настоящему изобретению. В случае фармацевтической композиции по настоящему изобретению предпочтительно, чтобы однородность конструкции на основе антитела составляла $\geq 80\%$, более предпочтительно $\geq 81\%$, $\geq 82\%$, $\geq 83\%$, $\geq 84\%$ или $\geq 85\%$, еще предпочтительнее $\geq 86\%$, $\geq 87\%$, $\geq 88\%$, $\geq 89\%$ или $\geq 90\%$, еще предпочтительнее $\geq 91\%$, $\geq 92\%$, $\geq 93\%$, $\geq 94\%$ или $\geq 95\%$ и наиболее предпочтительно $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$ или $\geq 99\%$.

Применяемый в данном документе термин "фармацевтическая композиция" относится к композиции, которая походит для введения пациенту, предпочтительно пациенту-человеку. В частности, предпочтительная фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит одну или несколько конструкций на основе антител по настоящему изобретению, предпочтительно в терапевтически эффективном количестве. Предпочтительно фармацевтическая композиция дополнительно содержит подходящие составы из одного или нескольких (фармацевтически эффективных) носителей, стабилизаторов, вспомогательных веществ, разбавителей, солюбилизаторов, поверхностно-

активных веществ, эмульгаторов, консервантов и/или адъювантов. Приемлемые составляющие композиции предпочтительно являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают без ограничения жидкие, замороженные и лиофилизированные композиции.

Композиции по настоящему изобретению могут содержать фармацевтически приемлемый носитель. В целом применяемый в данном документе "фармацевтически приемлемый носитель" означает какие-либо и все водные и неводные растворы, стерильные растворы, растворители, буферы, например, фосфатно-буферные солевые растворы (PBS), воду, суспензии, эмульсии, такие как эмульсии типа масло/вода, различные типы смачивающих средств, липосомы, дисперсионные среды и покрытия, которые совместимы с фармацевтическим введением, в частности с парентеральным введением. Применение таких сред и средств в фармацевтических композициях хорошо известно в данной области техники, а композиции, содержащие такие носители, можно составлять с помощью хорошо известных традиционных способов.

В определенных вариантах осуществления предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению и дополнительно одно или несколько вспомогательных веществ, таких как описанные в иллюстративных целях в данном разделе и в другом месте данного документа. При этом вспомогательные вещества могут применяться в настоящем изобретении для самых разнообразных целей, таких как регулирование физических, химических или биологических свойств составов, как, например, регулирование вязкости, и/или способов по настоящему изобретению для повышения эффективности, и/или стабилизации таких составов и способов от деградации и ухудшения качества, например, вследствие стрессовых воздействий, возникающих во время производства, доставки, хранения, подготовки перед использованием, введения и после него.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать материалы состава, предназначенные для модификации, поддержания или сохранения, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникновения композиции (см., REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A.R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company). В таких вариантах осуществления подходящие материалы для состава могут включать без ограничения:

- аминокислоты, такие как глицин, аланин, глутамин, аспарагин, треонин, пролин, 2-фенилаланин, в том числе заряженные аминокислоты, предпочтительно лизин, лизина ацетат, аргинин, глутамат и/или гистидин;
- противомикробные средства, такие как антибактериальные и противогрибковые средства;
- антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, метионин, ~~уорфил~~ гидросульфит натрия или гидросульфит натрия;

• буферы, буферные системы и буферные средства, которые применяются для поддержания композиции при физиологическом pH или при немного более низком pH; примерами буферов являются борат, бикарбонат, Tris-HCl, цитраты, фосфаты или другие органические кислоты, сукцинат, фосфат, гистидин; например, Tris-буфер при pH приблизительно 7,0-8,5;

• неводные растворители, такие как пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат;

• водные носители, включая воду, спиртовые/водные носители, эмульсии или суспензии, включая солевые и забуференные среды;

• биоразлагаемые полимеры, такие как сложные полиэфиры;

• объемообразующие средства, такие как маннит или глицин;

• хелатирующие средства, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA);

• изотонические средства и средства, замедляющие всасывание;

• комплексообразующие средства, такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин);

• наполнители;

• моносахариды; дисахариды и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины); при этом углеводы могут быть невозстанавливающими сахарами, предпочтительно трегалозой, октасульфатом сахарозы, сорбитом или ксилитом;

• (низкомолекулярные) белки, полипептиды или белковые носители, такие как человеческий или бычий сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины, предпочтительно полученные от человека;

• красящие и вкусоароматические средства;

• серосодержащие восстанавливающие средства, такие как глутатион, тиоктовая кислота, тиогликолят натрия, тиоглицерин, [альфа]-монотиоглицерин и тиосульфат натрия;

• разбавляющие средства;

• эмульгирующие средства;

• гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон;

• солеобразующие противоионы, такие как натрий;

• консерванты, такие как противомикробные средства, антиоксиданты, хелатообразующие средства, инертные газы и т. п.; при этом их примеры представляют собой: бензалкония хлорид, бензойную кислоту, салициловую кислоту, тиомерсал, фенетиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновую кислоту или перекись водорода;

• комплексы металлов, такие как комплексы Zn-белок;

• растворители и сорастворители (такие как ~~уорфилis~~ глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль);

• сахара и сахарные спирты, такие как трегалоза, октасульфат сахарозы, маннит, сорбит или ксилит, стахиоза, манноза, сорбоза, ксилоза, рибоза, миоинозитоza, галактоза,

лактит, рибит, миоинозит, галактит, глицерин, циклиты (например, инозит), полиэтиленгликоль и многоатомные сахарные спирты;

- суспендирующие средства;
- поверхностно-активные вещества или смачивающие средства, такие как плуроники, PEG, сложные эфиры сорбита, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат, тритон, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапал; при этом поверхностно-активные вещества могут быть детергентами предпочтительно с молекулярной массой $>1,2$ кДа и/или полиэфиром предпочтительно с молекулярной массой >3 кДа; при этом неограничивающими примерами предпочтительных детергентов являются Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 и Tween 85; неограничивающими примерами предпочтительных полиэфиров являются PEG 3000, PEG 3350, PEG 4000 и PEG 5000;
- средства, увеличивающие стабильность, такие как сахароза или сорбит;
- средства, повышающие тоничность, такие как галогениды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит, сорбит;
- среды-носители для парентеральной доставки, включая раствор хлорида натрия, раствор Рингера с декстрозой, хлорид натрия с декстрозой, раствор Рингера с лактатом или нелетучие масла;
- среды-носители для внутривенной доставки, включая вещества для восполнения жидкости и питательных веществ, вещества для восполнения электролитов (например, вещества в растворе Рингера с декстрозой).

Для специалистов в данной области техники очевидно, что разные составляющие фармацевтической композиции (например, перечисленные выше) могут оказывать разные эффекты, например, аминокислота может выполнять функцию буфера, стабилизатора и/или антиоксиданта; маннит может выполнять функцию объемобразующего средства и/или средства, повышающего тоничность; хлорид натрия может выполнять функцию средства для доставки и/или средства, повышающего тоничность, и т. д.

Подразумевается, что композиция по настоящему изобретению может содержать в дополнение к полипептиду по настоящему изобретению, определенному в данном документе, дополнительные биологически активные средства в зависимости от предполагаемого применения композиции. Такие средства могут представлять собой лекарственные средства, действующие на желудочно-кишечный тракт, лекарственные средства, действующие в качестве цитостатиков, лекарственные средства, предупреждающие ~~уорphilisation~~ гиперурикемию, лекарственные средства, подавляющие иммунные реакции (например, кортикостероиды), лекарственные средства, модулирующие воспалительную реакцию, лекарственные средства, действующие на кровеносную систему, и/или средства, такие как цитокины, известные из уровня техники. Также предусматривается, что конструкция на основе антитела по настоящему изобретению применяется в качестве средства для комбинированной терапии, т. е. в комбинации с другим противораковым лекарственным препаратом.

В определенных вариантах осуществления оптимальная фармацевтическая

композиция будет определяться специалистом в данной области техники в зависимости, например, от способа введения, формата доставки и требуемой дозировки. См., например, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше. В определенных вариантах осуществления такие композиции могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость выведения *in vivo* конструкции на основе антитела по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления основные среда-носитель или носитель в фармацевтической композиции могут быть либо водными, либо неводными по своей природе. Например, подходящими средой-носителем или носителем могут быть вода для инъекций, физиологический солевой раствор или искусственная спинномозговая жидкость, возможно дополненная другими материалами, традиционно используемыми в композициях для парентерального введения. Нейтральный забуференный солевой раствор или солевой раствор, смешанный с сывороточным альбумином, являются дополнительными иллюстративными средами-носителями. В определенных вариантах осуществления композиции, содержащие конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению, могут быть подготовлены для хранения посредством смешивания выбранной композиции, обладающей требуемой степенью чистоты, с необязательными средствами для составления (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше) в виде лиофилизированной массы или водного раствора. Кроме того, в определенных вариантах осуществления конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению можно составлять в виде лиофилизата, используя соответствующие вспомогательные вещества, такие как сахароза.

Если предполагается парентеральное введение, то терапевтические композиции для применения в настоящем изобретении можно обеспечивать в виде апирогенного приемлемого для парентерального введения водного раствора, содержащего требуемую конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению в фармацевтически приемлемой среде-носителе. В частности, подходящей средой-носителем для парентеральной инъекции является стерильная дистиллированная вода, в которой конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению составляют в виде стерильного, изотонического раствора, с добавлением соответствующих консервантов. В определенных вариантах осуществления получение может включать составление требуемой молекулы с таким средством, как инъецируемые микросферы, биоразлагаемые частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), гранулы или липосомы, которые могут обеспечивать контролируемое или замедленное высвобождение продукта, который может быть доставлен посредством депо-инъекции. В определенных вариантах осуществления также может применяться гиалуроновая кислота, обладающая эффектом содействия увеличения времени пребывания в системном кровотоке. В определенных вариантах осуществления имплантируемые устройства для доставки лекарственных средств могут быть использованы для введения требуемой конструкции на основе антитела.

Для специалистов в данной области техники будут очевидны дополнительные

фармацевтические композиции, включая составы, содержащие конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению в составах для замедленного высвобождения или контролируемой доставки/высвобождения. Также специалистам в данной области техники известны методики составления ряда других средств с замедленной или контролируемой доставкой, таких как липосомные носители, биоразлагаемые микрочастицы или пористые гранулы, а также депо-инъекции. См., например, международную патентную заявку № PCT/US93/00829, в которой описано контролируемое высвобождение из пористых полимерных микрочастиц, применяемых для доставки фармацевтических композиций. Препараты с замедленным высвобождением могут включать полупроницаемые полимерные матрицы в виде формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Матрицы для замедленного высвобождения могут включать сложные полиэфиры, гидрогели, полилактиды (раскрытые в патенте США № 3773919 и публикации заявки на европейский патент № EP 058481), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556), поли(2-гидроксиэтилметакрилат) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 и Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), этиленвинилацетат (Langer et al., 1981, выше) или поли-D(-)-3-гидроксимасляную кислоту (публикация заявки на европейский патент EP № 133988). Композиции с замедленным высвобождением могут также включать липосомы, которые могут быть получены посредством любого из нескольких способов, известных в данной области техники. См., например, Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692; публикации заявок на европейский патент №№ EP 036676; EP 088046 и EP 143949.

Конструкцию на основе антитела также можно заключать в микрокапсулы, полученные, например, с помощью методик коацервации или с помощью полимеризации на границе раздела фаз (например, микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или хитина и микрокапсулы из полиметилметакрилата соответственно), в коллоидные системы доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методики раскрыты в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980).

Фармацевтические композиции, применяемые для введения *in vivo*, как правило, предусмотрены в виде стерильных препаратов. Стерилизация может быть достигнута посредством фильтрации через мембраны для стерильной фильтрации. Если композицию лиофилизируют, стерилизацию с помощью данного способа можно выполнять либо перед лиофилизацией и восстановлением, либо после них. Композиции для парентерального введения могут храниться в лиофилизированной форме или в виде раствора. Обычно композиции для парентерального введения помещают в контейнер, имеющий стерильное входное отверстие, например, пакет или флакон для внутривенного раствора с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций.

Другой аспект настоящего изобретения включает самобуферизующиеся составы, содержащие конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению, которые можно использовать в качестве фармацевтических композиций, как описано в международный

патентной заявке WO 06138181A2 (PCT/US2006/022599). Доступные различные объяснения, касающиеся стабилизации белка, а также материалов для составления и способов, применимых в этом отношении, как, например, Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," Pharm Res. 8(3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution" в: RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter and Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002), и Randolph et al., "Surfactant-protein interactions", Pharm Biotechnol. 13: 159-75 (2002), в частности, смотрите части, относящиеся к вспомогательным веществам и связанным с ними способам, относящимся к самобуферизующимся составам на основе белков в соответствии с настоящим изобретением, в особенности к белковым фармацевтическим продуктам и способам для путей применения в ветеринарии и/или медицине человека.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения можно использовать соли, например, для регулирования ионной силы и/или изотоничности состава и/или улучшения растворимости и/или физической стабильности белка или другого ингредиента композиции в соответствии с настоящим изобретением. Хорошо известно, что ионы могут стабилизировать нативное состояние белков путем связывания с заряженными остатками на поверхности белка и путем экранирования заряженных и полярных групп в белке и снижения силы их электростатических взаимодействий, притягивающих и отталкивающих взаимодействий. Ионы также могут стабилизировать денатурированное состояние белка, в частности, путем связывания денатурированных пептидных связей (-CONH) белка. Кроме того, ионное взаимодействие с заряженными и полярными группами в белке также может уменьшить межмолекулярные электростатические взаимодействия и, за счет этого, предотвращать или уменьшать агрегацию и нерастворимость белка.

Разновидности ионов существенно отличаются по своим влияниям на белки. Был разработан ряд категориальных рангов ионов и их влияния на белки, которые можно применять при составлении фармацевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением. Один пример представляет собой ряд Гофмейстера, который ранжирует ионные и полярные неионные растворенные вещества по их влиянию на конформационную стабильность белков в растворе. Стабилизирующие растворенные вещества называются "космотропными". Дестабилизирующие растворенные вещества называются "хаотропными". Космотропы обычно используются в высоких концентрациях (например, >1 молярный сульфат аммония) для осаждения белков из раствора ("высаливание"). Хаотропы обычно используются для денатурации и/или для солюбилизации белков ("всаливание"). Относительная эффективность ионов в отношении "всаливания" и "высаливания" определяет их положение в ряде Гофмейстера.

Свободные аминокислоты можно использовать в составах, содержащих конструктор на основе антитела по настоящему изобретению в соответствии с различными вариантами осуществления настоящего изобретения, в качестве объемообразующих

средств, стабилизаторов и антиоксидантов, а также для других стандартных вариантов применения. Лизин, пролин, серин и аланин могут быть использованы для стабилизации белков в составе. Глицин пригоден при лиофилизации для обеспечения правильной структуры и свойств массы. Аргинин может быть пригоден для ингибирования агрегации белка как в жидких, так и в лиофилизированных составах. Метионин применим в качестве антиоксиданта.

Полиолы включают сахара, например, маннит, сахарозу и сорбит, и многоатомные спирты, такие как, например, глицерин и пропиленгликоль, и для целей обсуждения в данном документе полиэтиленгликоль (PEG) и родственные ему вещества. Полиолы являются космотропными. Они представляют собой применимые стабилизирующие средства как в жидких, так и в лиофилизированных составах для защиты белков от процессов физической и химической деградации. Полиолы также применимы для регулирования тоничности составов. В число полиолов, применимых в выбранных вариантах осуществления настоящего изобретения, входит маннит, обычно применяемый для обеспечения структурной стабильности массы в лиофилизированных составах. Он обеспечивает структурную стабильность массы. Обычно его применяют с лиопротектором, например сахарозой. Сорбит и сахароза являются одними из предпочтительных средств для регулирования тоничности и в качестве стабилизаторов для защиты от стрессов, обусловленных замерзанием-оттаиванием, во время транспортировки или при получении нерасфасованного продукта в способе производства. Восстанавливающие сахара (которые содержат свободные альдегидные или кетонные группы), такие как глюкоза и лактоза, могут ~~уменьшить~~ гидролизировать поверхностные остатки лизина и аргинина. Следовательно, они обычно не входят в число предпочтительных полиолов для применения в соответствии с настоящим изобретением. Кроме того, сахара, которые образуют такие реакционноспособные молекулы, такие как сахароза, которая гидролизует до фруктозы и глюкозы в кислых условиях и, следовательно, вызывает гликирование, также не входят в число предпочтительных полиолов по настоящему изобретению в этом отношении. PEG применим для стабилизации белков и в качестве криопротектора, и в этом отношении может применяться в настоящем изобретении.

Варианты осуществления составов, содержащих конструкции на основе антитела по настоящему изобретению, дополнительно предусматривают поверхностно-активные вещества. Молекулы белка могут быть подвержены адсорбции на поверхностях и денатурации и последующей агрегации на границах раздела воздух-жидкость, твердое тело-жидкость и жидкость-жидкость. Эти эффекты обычно обратно пропорциональны концентрации белка. Как правило, эти вредные взаимодействия обратно пропорциональны концентрации белка и, как правило, усугубляются при физическом перемешивании, например, возникающем при транспортировке и манипуляциях с продуктом. Для предотвращения, сведения к минимуму или уменьшения адсорбции на поверхности традиционно применяются поверхностно-активные вещества. Применимые в этом отношении поверхностно-активные вещества в настоящем изобретении включают

полисорбат 20, полисорбат 80, другие сложные эфиры жирных кислот и сорбитанполиэтоксилатов и полоксамер 188. Поверхностно-активные вещества также обычно применяются для контроля конформационной стабильности белка. Применение поверхностно-активных веществ в этом отношении является специфичным для белка, поскольку любое указанное поверхностно-активное вещество, как правило, стабилизирует одни белки и дестабилизирует другие.

Полисорбаты подвержены окислительной деградации и зачастую при поставке содержат достаточное количество пероксидов, чтобы вызвать окисление боковых цепей белковых остатков, особенно метионина. Следовательно, полисорбаты следует применять осторожно, и при их применении их следует использовать в наименьшей эффективной концентрации. В этом отношении полисорбаты служат примером общего правила, согласно которому вспомогательные вещества следует применять в их наименьших эффективных концентрациях.

Варианты осуществления составов, содержащих конструкции на основе антитела по настоящему изобретению, дополнительно предусматривают один или несколько антиоксидантов. В некоторой степени вредное окисление белков может быть предотвращено в фармацевтических составах путем поддержания надлежащих уровней кислорода и температуры окружающей среды и путем избегания воздействия света. Антиоксидантные вспомогательные вещества также могут применяться для предотвращения окислительной деградации белков. К числу применимых в этом отношении антиоксидантов относятся восстанавливающие средства, поглотители кислорода/свободных радикалов и хелатирующие средства. Антиоксиданты для применения в составах на основе терапевтического белка в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно являются водорастворимыми и сохраняют свою активность на протяжении всего срока годности продукта. В этом отношении EDTA является предпочтительным антиоксидантом в соответствии с настоящим изобретением. Антиоксиданты могут повреждать белки. Например, восстанавливающие средства, в частности, такие как глутатион, могут нарушать внутримолекулярные дисульфидные связи. Таким образом, антиоксиданты для применения в настоящем изобретении, среди прочего, выбраны для устранения или достаточной степени уменьшения возможности повреждения белков в составе.

Составы в соответствии с настоящим изобретением могут включать ионы металлов, которые являются кофакторами белков и которые необходимы для образования координационных комплексов в белках, как, например, цинк, необходимый для образования определенных суспензий инсулина. Ионы металлов также могут ингибировать некоторые процессы, которые приводят к деградации белков. Однако ионы металлов также катализируют физические и химические процессы, которые приводят к деградации белков. Ионы магния (10-120 мМ) могут быть использованы для ингибирования изомеризации аспарагиновой кислоты в изоаспарагиновую кислоту. Ионы Ca^{+2} (до 100 мМ) могут повышать стабильность дезоксирибонуклеазы человека. Однако Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} могут

дестабилизировать rhDNase. Аналогичным образом, Ca^{+2} и Sr^{+2} могут стабилизировать фактор VIII, при этом он может дестабилизироваться за счет ионов Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} , Cu^{+2} и Fe^{+2} , и его агрегация может быть увеличена за счет ионов Al^{+3} .

Варианты осуществления составов, содержащих конструкции на основе антитела по настоящему изобретению, дополнительно предусматривают один или несколько консервантов. Консерванты необходимы при разработке многодозовых составов для парентерального введения, которые предусматривают более одного отбора из того же контейнера. Их основная функция заключается в подавлении роста микроорганизмов и обеспечении стерильности продукта на протяжении всего срока годности или срока применения лекарственного продукта. Традиционно используемые консерванты включают бензиловый спирт, фенол и м-крезол. Хотя консерванты давно применяются с низкомолекулярными препаратами для парентерального введения, разработка составов на основе белков, включающих консерванты, может быть сложной задачей. Консерванты практически всегда оказывают дестабилизирующее влияние на белки (вызывают агрегацию), и это стало основным фактором, ограничивающим их применение в многодозовых составах на основе белка. На сегодняшний день большинство лекарственных средств на основе белка были составлены только для однократного применения. Однако, если возможно получать многодозовые составы, они имеют дополнительное преимущество, заключающееся в обеспечении удобства для пациентов и улучшении рыночной привлекательности. Хорошим примером является гормон роста человека (hGH), в случае с которым разработка составов с добавлением консервантов привела к появлению на рынке более удобных форм выпуска в виде многоразовых шприцев-ручек. В настоящее время на рынке доступны по меньшей мере четыре таких устройства в виде шприцев-ручек, содержащих составы на основе hGH с добавлением консервантов. Norditropin (жидкость, Novo Nordisk), Nutropin AQ (жидкость, Genentech) и Genotropin (лиофилизированный-двухкамерный картридж, Pharmacia & Upjohn) содержат фенол, в то время как Somatropе (Eli Lilly) содержит м-крезол. При составлении и разработке составов с добавлением консервантов необходимо учитывать несколько аспектов. Эффективная концентрация консерванта в лекарственном продукте должна быть оптимизирована. Для этого необходимо провести тестирование данного консерванта в лекарственной форме в диапазонах концентраций, которые обеспечивают противомикробную эффективность без нарушения стабильности белка.

Как можно было ожидать, разработка жидких составов, содержащих консерванты, является более сложной задачей, чем разработка лиофилизированных составов. Высушенные сублимацией продукты можно лиофилизировать без консерванта и восстанавливать разбавителем, содержащим консервант, в момент применения. Это сокращает время, в течение которого консервант контактирует с белком, значительно минимизируя связанные с этим риски для стабильности. При использовании жидких составов эффективность и стабильность консерванта должны поддерживаться в течение всего срока годности продукта (приблизительно 18-24 месяца). Важно отметить, что

эффективность консерванта должна быть продемонстрирована в конечном составе, содержащем активное лекарственное средство и все вспомогательные компоненты.

Конструкции на основе антител, раскрытые в данном документе, также можно составлять в виде ~~уорн-липосом-иммунолипосом~~. "Липосома" представляет собой небольшую везикулу, состоящую из различных типов липидов, фосфолипидов и/или поверхностно-активного вещества, которая применима для доставки лекарственного средства млекопитающему. Компоненты липосомы обычно организованы в виде бислойной структуры, аналогичной организации липидов в биологических мембранах. Липосомы, содержащие конструкции на основе антитела, получают с помощью способов, известных в данной области техники, таких как описанные в Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); в патентах США №№ 4485045 и 4544545; а также в W0 97/38731. Липосомы с увеличенным временем циркуляции в кровотоке раскрыты в патенте США № 5013556. С помощью способа обращенно-фазового выпаривания можно получить особенно применимые липосомы, в липидном составе которых содержатся фосфатидилхолин, холестерин и PEG-derivatизированный фосфатидилэтаноламин (PEG-PE). Липосомы экстрадируют через фильтры с заданным размером пор с получением липосом требуемого диаметра. Fab'-фрагменты конструкции на основе антитела по настоящему изобретению можно конъюгировать с липосомами, как описано в Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982), посредством реакции дисульфидного обмена. Внутри липосомы необязательно содержится химиотерапевтическое средство. см. Gabizon et al. J. National Cancer Inst. 81 (19) 1484 (1989).

После того, как фармацевтическая композиция была составлена, ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества, кристалла либо в виде обезвоженного или лиофилизированного порошка. Такие составы можно хранить либо в готовой к применению форме, либо в форме (например, лиофилизированной), которую восстанавливают перед введением.

Биологическую активность фармацевтической композиции, указанной в данном документе, можно определять, например, с помощью анализов цитотоксичности, описанных в следующих примерах, в WO 99/54440 или в Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12). Применяемый в данном документе термин "эффективность" или "in vivo эффективность" относится к ответу на терапию фармацевтической композицией по настоящему изобретению с применением, например, стандартизированных критериев ответа NCI. Успех или in vivo эффективность терапии с применением фармацевтической композиции по настоящему изобретению относится к эффективности композиции в отношении предполагаемой для нее задачи, т. е. способности композиции достигать требуемого эффекта, т. е. уничтожения патологических клеток, например, опухолевых клеток. In vivo эффективность можно отслеживать с помощью общепринятых стандартных способов для соответствующих нозологических форм, включая без ограничения подсчет количества лейкоцитов, определение лейкоцитарной формулы, сортировку клеток с активированной флуоресценцией, аспирацию костного мозга. В

дополнение можно использовать параметры клинической биохимии, специфические для конкретного заболевания, а также другие общепринятые стандартные способы. Кроме того, можно использовать компьютерную томографию, рентгеновское исследование, ядерную магнитно-резонансную томографию (например, для оценки ответа на основании критериев Национального института рака [Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, Lister TA, Vose J, Grillo-Lopez A, Hagenbeek A, Cabanillas F, Klippensten D, Hiddemann W, Castellino R, Harris NL, Armitage JO, Carter W, Hoppe R, Canellos GP. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. J Clin Oncol. 1999 Apr;17(4):1244]), позитронно-эмиссионное томографическое сканирование, подсчет количества лейкоцитов, определение лейкоцитарной формулы, сортировку клеток с активированной флуоресценцией, аспирацию костного мозга, исследования биоптатов/гистологических срезов лимфатических узлов и различные параметры клинической биохимии, специфические для лимфомы (например, уровень лактатдегидрогеназы), а также другие общепринятые стандартные способы.

Другой значительной проблемой в разработке лекарственных средств, таких как фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, является прогнозируемое модулирование фармакокинетических свойств. В связи с этим можно устанавливать фармакокинетический профиль лекарственного средства-кандидата, т. е. профиль фармакокинетических параметров, влияющих на способность конкретного лекарственного средства к лечению указанного состояния. Фармакокинетические параметры лекарственного средства, влияющие на способность лекарственного средства к лечению определенной нозологической формы, включают без ограничения: период полувыведения, объем распределения, метаболизм при первом прохождении через печень и степень связывания с белками сыворотки крови. На эффективность указанного лекарственного средства может влиять любой из параметров, упомянутых выше. Предусмотренной характеристикой конструкций на основе антител по настоящему изобретению, обеспеченных специфической формой Fc, является, например, наличие у них различий в фармакокинетическом поведении. Нацеливающаяся конструкция на основе антитела с увеличенным периодом полувыведения в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно демонстрирует удивительно увеличенное время пребывания *in vivo* по сравнению с "каноническими", не содержащими HLE вариантами указанной конструкции на основе антитела.

"Период полувыведения" означает время, когда 50% введенного лекарственного средства элиминируется посредством биологических процессов, например, метаболизма, экскреции и т. д. Под "метаболизмом при первом прохождении через печень" подразумевается подверженность лекарственного средства метаболизму после первого контакта с печенью, т. е. во время его первого прохождения через печень. "Объем распределения" означает степень удержания лекарственного средства в различных компартментах организма, таких как, например, внутриклеточное и внеклеточное

пространство, ткани и органы и т. п., и распределение лекарственного средства в пределах этих компартментов. "Степень связывания с белками сыворотки крови" означает подверженность лекарственного средства к взаимодействию и связыванию с белками сыворотки крови, такими как альбумин, что приводит к уменьшению или потере биологической активности лекарственного средства.

Фармакокинетические параметры также включают биодоступность, лаг-период (Tlag), Tmax, скорость всасывания, начало действия и/или Cmax для данного количества вводимого лекарственного средства. "Биодоступность" означает количество лекарственного средства в компартменте крови. "Лэг-период" означает задержку по времени между введением лекарственного средства и его обнаружением и возможность его измерения в крови или плазме крови. "Tmax" представляет собой время, за которое достигается максимальная концентрация лекарственного средства в крови, а "Cmax" представляет собой максимальную концентрацию в крови, наблюдаемую для данного лекарственного средства. На время, за которое достигается концентрация лекарственного средства в крови или ткани, которая требуется для биологического действия, влияют все параметры. Фармакокинетические параметры конструкций на основе биспецифических антител, проявляющих межвидовую специфичность, которые можно определить в доклиническом тестировании на животных с участием приматов, отличных от шимпанзе, как указано выше, также изложены, например, в публикации Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12).

В предпочтительном аспекте настоящего изобретения фармацевтическая композиция является стабильной в течение по меньшей мере четырех недель при приблизительно -20°C. Как очевидно из прилагаемых примеров, качество конструкции на основе антитела по настоящему изобретению в сравнении с качеством соответствующих конструкций на основе антител из известного уровня техники можно тестировать с применением разных систем. Считается, что такие тесты соответствуют "ICH Harmonised Tripartite Guideline: *Stability Testing of Biotechnological/Biological Products Q5C* и *Specifications: Test procedures and Acceptance Criteria for Biotech Biotechnological/Biological Products Q6B*", и таким образом выбраны для обеспечения профиля, указывающего на стабильность, который обеспечивает уверенность в том, что выявляются изменения в идентичности, чистоте и эффективности продукта. Является общепринятым, что термин чистота является относительным термином. Вследствие влияния гликозилирования, дезамидирования или других видов гетерогенности абсолютную чистоту биотехнологического/биологического продукта, как правило, следует оценивать с помощью более чем одного способа, а полученное значение чистоты зависит от способа. В рамках тестирования стабильности тесты на чистоту должны делать акцент на способах определения продуктов деградации.

Для оценки качества фармацевтической композиции, содержащей конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению, можно проводить анализ, например, анализ содержания растворимых агрегатов в растворе (HMWS, оцениваемые с помощью

эксклюзионной хроматографии). Предпочтительно, чтобы показатель стабильности при выдерживании в течение по меньшей мере четырех недель при приблизительно -20°C характеризовался содержанием менее 1,5% HMWS, предпочтительно менее 1% HMWS.

Предпочтительный способ анализа качества продукта в данном документе представляет собой эксклюзионную хроматографию-высокоэффективную жидкостную хроматографию (SE-HPLC). SE-HPLC обычно проводят с применением колонки для эксклюзионной хроматографии и системы UHPLC, например, колонки для эксклюзионной хроматографии Waters BEH200 ($4,6 \times 150$ мм, 1,7 мкм) и системы UHPLC от Waters. Образцы белка вводят в чистом виде и изократически разделяют с применением фосфатного буфера, например, содержащего соль NaCl (подвижная фаза представляла собой 100 мМ фосфата натрия, 250 мМ NaCl при pH 6,8), при скорости потока, например, 0,4 мл/мин, и элюент отслеживали по поглощению УФ при 280 нм. Как правило, загружают приблизительно 6 мкг образца.

Перед началом проведения способа СМ, как правило, размораживают флакон, содержащий клетки СНО, экспрессирующие конструкцию на основе биспецифического антитела. Во время наращивания биомассы клетки ресуспендируют в свежей селективной ростовой среде при целевой плотности жизнеспособных клеток (VCD). Объем культуры последовательно увеличивают во встряхиваемых колбах или биореакторах для создания количества клеточной массы, достаточного для инокуляции, в конечном итоге, в продукционный биореактор для перфузионного культивирования (например, масштабом 10 л или 50 л или более).

После инокуляции клеток в продукционный биореактор при диапазоне концентраций, указанном в данном документе, происходит начальная фаза роста клеток в течение периода из нескольких дней, обычно приблизительно 7-28 дней, для увеличения плотности клеток и биомассы до предпочтительного заданного значения, описанного в данном документе и измеренного емкостного зонда (Hamilton Bonaduz AG, Швейцария). Продукционный биореактор поддерживают при предпочтительном pH, как правило, приблизительно 6-7,4, например pH 6,85, при уровне растворенного кислорода, составляющем, например, 64 мм рт. ст., и температуре приблизительно 36°C . Перфузионное культивирование начинают после нескольких дней фазы роста клеток, как правило, в день 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, предпочтительно в день 4, с применением системы фильтрации с переменным тангенциальным потоком (ATF) (например, Refine Technologies, Ганновер, Нью-Джерси) с фильтрами, такими как фильтры из полиэфирсульфона с размером пор 0,2 мкм (например, GE Healthcare, Питтсбург, Пенсильвания), и подходящей перфузионной средой с определенным химическим составом при скорости перфузии в VVD, описанной в данном документе, например, при скорости перфузии 0,4 биореактора VVD. Скорость перфузии, как правило, увеличивают постепенно, например, от 0,4 VVD в день 4 до 2 VVD в день 12. После достижения заданного значения биомассы в последний день постепенного увеличения VVD температуру культуры клеток, как правило, снижают, например, до $33,5^{\circ}\text{C}$, начинают сбор HCCF (т. е. бесклеточного пермеата, содержащего конструкцию на

основе биспецифического антитела) и перфузионное культивирование продолжают в течение периода, описанного в данном документе, например, в течение по меньшей мере 7, 14, 28 или 40 дополнительных дней, предпочтительно по меньшей мере 28 дней, путем подпитки при установленной скорости перфузии, как правило, при самой высокой скорости перфузии в VVD, к которой привело постепенное увеличение (т. е. удельной скорости перфузии, CSPR, в стационарной фазе, например, составляющей 0,02-0,03 нл/клетка-день) и вымывают лишние клетки для поддержания предпочтительного заданного значения биомассы. Плотность клеток (измеренную по CDV, например, с помощью Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс), метаболиты (измеренные, например, с помощью NovaFlex, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс) и титр пермеата (измеренный посредством HPLC-анализа), как правило, измеряют на протяжении всего времени культивирования. HCCF собирают предпочтительно при комнатной температуре непрерывно или с интервалами, например, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 или 144 часа, и подвергают дальнейшей хроматографии с захватом с помощью белка-L. Элюат из белка-L, например, в дни 26, 27, 34, 40, анализируют в отношении показателей качества продукта и связанных со способом примесей с применением аналитической катионообменной хроматографии (CEX-HPLC), пептидного картирования и/или ELISA для выявления НСР.

Триптическое пептидное картирование для выявления химических модификаций

Образцы белка конструкции на основе биспецифического антитела расщепляют посредством способа на основе фильтра с применением, например, устройство Millipore Microcon 30K. Образец белка вносят на фильтр, центрифугируют для удаления матрикса из образца, затем денатурируют, например, в буфере на основе 6 М гидрохлорида гуанидина (GuHCl) (например, Thermo Fisher Scientific, Рокфорд, Иллинойс), содержащем метионин, восстанавливают, например, с помощью 500 мМ дитиотреитола (DTT) (например, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури), при, например, 37°C в течение 30 мин и затем подвергают алкилированию посредством инкубации, например, с 500 мМ иодуксусной кислотой (IAA) (например, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури), например, в течение 20 мин в темноте при комнатной температуре. Непрореагировавшую IAA гасят с помощью добавления DTT. Все вышеперечисленные стадии происходят на фильтре. Затем в образцах проводят замену буфера на буфер для расщепления (например, 50 мМ Tris, pH 7,8, содержащий метионин) с помощью центрифугирования для удаления любых остаточных количеств DTT и IAA. Расщепление трипсином проводят на фильтре, например, в течение 1 ч при 37°C с применением отношения фермента к белку 1:20 (вес/вес). Смесь, полученную в результате расщепления, собирают с помощью центрифугирования и затем гасят, например, путем добавления 8 М GuHCl в ацетатном буфере при pH 4,7.

Анализ на основе жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LC-MS) проводят с применением системы для сверхэффективной жидкостной хроматографии (UPLC), например, Thermo U-3000, непосредственно сопряженной с масс-спектрометром, например, Thermo Scientific Q-Exactive. Продукты расщепления белков разделяли с помощью обращенной фазы с применением колонки Agilent Zorbax C18 RR HD (2,1×150

мм, 1,8 мкм), при этом температуру колонки поддерживали на уровне 50°C. Подвижная фаза А состояла из 0,020% (объем/объем) муравьиной кислоты (FA) в воде, а подвижная фаза В представляла собой 0,018% (объем/объем) FA в ацетонитриле (I). В колонку вводят приблизительно 5 мкг расщепленной конструкции на основе биспецифического антитела. Для разделения пептидов применяют градиент (например, от 0,5 до 36% фазы В за 145 мин) при скорости потока, составляющей, например, 0,2 мл/мин. Элюируемые пептиды отслеживают с помощью MS.

Как правило, для идентификации пептидов и анализа их модификаций используют эксперимент с зависимой от данных tandemной MS (MS/MS). Как правило, получают полную сканограмму, например, от 200 до 2000 масса/заряд, в режиме положительных ионов, за которой следует, например, 6 сканограмм при зависимой от данных MS/MS для идентификации последовательности пептида. Количественная оценка основана на данных масс-спектрометрии выбранного отслеживания ионов с применением приведенного ниже уравнения:

$$\% \text{ модификации} = \frac{A_{\text{модифиц}}}{A_{\text{модифиц}} + A_{\text{немодифиц}}} \times 100$$

где % модификации представляет собой уровень модифицированных пептидов, $A_{\text{модифиц}}$ представляет собой область хроматограммы по выделенному иону для модифицированного пептида, $A_{\text{немодифиц}}$ представляет собой область хроматограммы по выделенному иону для немодифицированного пептида.

ELISA для выявления белка клетки-хозяина (HCP)

Микротитрационный планшет покрывают иммуноглобулином G кролика (IgG) к HCP (Amgen, полученное в лаборатории антитело). После того, как планшет промывают и блокируют, тестовые образцы, контроли и калибровочные стандарты HCP добавляют в планшет и инкубируют. Несвязавшиеся белки вымывают из планшета и в планшет добавляют объединенный IgG кролика к HCP, конъюгированный с биотином (Amgen, полученное в лаборатории антитело) и инкубируют. После еще одной промывки в планшет добавляют конъюгат Streptavidin™ с пероксидазой хрена (HRP-конъюгат) (например, Amersham-GE, Бакингемшир, Великобритания) и инкубируют. Планшет промывают в последний раз и в планшет добавляют хромогенный субстрат тетраметилбензидин (TMB) (например, Kirkegaard and Perry Laboratories, Гейтерсберг, Мэриленд). Проявление цвета останавливают с помощью 1 М фосфорной кислоты, и оптическую плотность измеряют с помощью спектрофотометра.

Предпочтительный состав для конструкции на основе антитела в виде фармацевтической композиции может, например, содержать компоненты состава, описанные ниже.

- Состав:
- фосфат калия, гидрохлорид L-аргинина, трегалоза, полисорбат 80 при pH 6,0.

Другие примеры для оценки стабильности конструкции на основе антитела по

настоящему изобретению в форме фармацевтической композиции предусмотрены в прилагаемых примерах 4-12. В этих примерах варианты осуществления конструкций на основе антител по настоящему изобретению тестируют в разных стрессовых условиях в виде разных фармацевтических составов, а результаты сравнивают с другими увеличивающими период полувыведения (HLE) форматами конструкции на основе биспецифического антитела, рекрутирующего Т-клетки, которые известны из уровня техники. В целом предусматривается, что конструкции на основе антител, обеспеченные специфической формой Fc в соответствии с настоящим изобретением, как правило, более стабильны в широком диапазоне стрессовых условий, таких как стрессовое воздействие температуры и света, по сравнению с конструкциями на основе антител, обеспеченными различными форматами HLE и без какого-либо формата HLE (например, конструкции на основе "канонических" антител). Указанная температурная стабильность может касаться как пониженной (ниже комнатной температуры, включая замораживание), так и повышенной (выше комнатной температуры, включая температуры вплоть до или выше температуры тела) температуры. Как будет понятно специалисту в данной области техники, такая улучшенная стабильность в отношении стрессовых воздействий, которых трудно избежать в клинической практике, делает конструкцию на основе антитела более безопасной, так как в клинической практике будет появляться меньше продуктов деградации. Соответственно, указанная повышенная стабильность означает повышенную безопасность.

В одном варианте осуществления предусмотрена конструкция на основе антитела по настоящему изобретению или конструкция на основе антитела, полученная в соответствии со способом по настоящему изобретению, для применения в предупреждении, лечении или уменьшении тяжести пролиферативного заболевания, опухолевого заболевания, вирусного заболевания или иммунологического нарушения.

Описанные в данном документе составы применимы в качестве фармацевтических композиций при лечении, уменьшении тяжести и/или предупреждении патологического медицинского состояния, описанного в данном документе, у нуждающегося в этом пациента. Термин "лечение" относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам. Лечение включает применение или введение состава в организм, выделенную ткань или клетку пациента, у которого имеется заболевание/нарушение, симптом заболевания/нарушения или предрасположенность к заболеванию/нарушению, с целью лечения, излечения, смягчения, облегчения, изменения, исправления, уменьшения тяжести, улучшения или воздействия на заболевание, симптом заболевания или предрасположенность к заболеванию.

Применяемый в данном документе термин "уменьшение интенсивности" относится к любому улучшению болезненного состояния пациента, имеющего опухоль, или рак, или метастатический рак, указанные в данном документе ниже, путем введения конструкции на основе антитела в соответствии с настоящим изобретением нуждающемуся в этом субъекту. Такое улучшение может также наблюдать как замедление или остановку

прогрессирования опухоли, или рака, или метастатического рака у пациента. Применяемый в данном документе термин "предупреждение" означает предотвращение возникновения или повторного возникновения у пациента, имеющего опухоль, или рак, или метастатический рак, указанные в данном документе ниже, путем введения конструкции на основе антитела в соответствии с настоящим изобретением нуждающемуся в этом субъекту.

Термин "заболевание" относится к любому состоянию, для которого будет наблюдаться положительный результат лечения с помощью конструкции на основе антитела или фармацевтической композиции, описанных в данном документе. Оно включает хронические и острые нарушения или заболевания, включая те патологические состояния, которые являются причиной предрасположенности млекопитающего к рассматриваемому заболеванию.

"Новообразование" представляет собой аномальный рост ткани, обычно, но не всегда, образующий массу. Когда также образуется масса, ее обычно называют "опухолью". Новообразования или опухоли могут быть доброкачественными, потенциально злокачественными (предраковыми) или злокачественными. Злокачественные новообразования обычно называют раком. Они обычно инвазируют и разрушают окружающую ткань и могут образовывать метастазы, т. е. они распространяются в другие части, ткани или органы тела. Следовательно, термин "метастатический рак" охватывает метастазы в другие ткани или органы, отличные от места происхождения опухоли. Виды лимфомы и лейкоза представляют собой лимфоидные новообразования. Для целей настоящего изобретения они также охватываются терминами "опухоль" или "рак".

Термин "вирусное заболевание" описывает заболевания, которые являются результатом вирусной инфекции у субъекта.

Применяемый в данном документе термин "иммунологическое нарушение" описывает, в соответствии с общим определением этого термина, иммунологические нарушения, такие как аутоиммунные заболевания, виды гиперчувствительности, иммунодефициты.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен способ лечения или уменьшения тяжести пролиферативного заболевания, опухолевого заболевания, вирусного заболевания или иммунологического заболевания, включающий стадию введения нуждающемуся в этом субъекту конструкции на основе антитела по настоящему изобретению или полученной в соответствии со способом по настоящему изобретению.

Термины "нуждающийся субъект" или "нуждающиеся в лечении" включают тех, у кого уже имеется нарушение, а также тех, у кого нарушение должно быть предупреждено. Нуждающийся субъект или "пациент" включают людей или других субъектов-млекопитающих, которые получают либо профилактическое, либо терапевтическое лечение.

Помимо прочего, конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению

обычно будут разрабатывать для специфических путей и способов введения, для специфических дозировок и частот введения, для специфических средств лечения специфических заболеваний, с определенными диапазонами биодоступности и способности сохранения в организме. Материалы композиции предпочтительно составляют при концентрациях, которые являются приемлемыми для данного места введения.

Таким образом, могут разрабатываться составы и композиции в соответствии с настоящим изобретением для доставки с помощью любого подходящего пути введения. В контексте настоящего изобретения пути введения включают без ограничения:

- местные пути (такие как накожный, ингаляционный, назальный, ~~офтальмологический~~, ~~аурикулярный/ушной~~, вагинальный, мукозальный);
- энтеральные пути (такие как пероральный, желудочно-кишечный, сублингвальный, сублабиальный, буккальный, ректальный) и
- парентеральные пути (такие как внутривенный, внутриартериальный, внутрикостный, внутримышечный, внутримозговой, интрацеребровентрикулярный, эпидуральный, интратекальный, подкожный, внутрибрюшинный, экстраамниотический, внутрисуставной, внутрисердечный, внутрикожный, внутриочаговый, внутриматочный, интравезикальный, интравитреальный, трансдермальный, интраназальный, трансмукозальный, интрасиновиальный, интралюминальный).

Фармацевтические композиции и конструкция на основе антитела по настоящему изобретению являются особенно применимы для парентерального введения, например, подкожной или внутривенной доставки, например, путем инъекции, такой как болюсная инъекция, или путем инфузии, такой как непрерывная инфузия. Фармацевтические композиции могут вводиться с применением устройства медицинского назначения. Примеры устройств медицинского назначения для введения фармацевтических композиций описаны в патентах США №№ 4475196; 4439196; 4447224; 4447 233; 4486194; 4487603; 4596556; 4790824; 4941880; 5064413; 5312335; 5312335; 5383851 и 5399163.

В частности, в данном изобретении предусмотрено непрерывное введение подходящей композиции. В качестве неограничивающего примера непрерывное или фактически непрерывное, т. е. продолжительное, введение можно осуществлять с помощью небольшой носимой пациентом насосной системы для отмеривания подачи терапевтического средства в организм пациента. Фармацевтическую композицию, содержащую конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению, можно вводить с помощью указанных насосных систем. Такие насосные системы в целом известны в данной области техники, и они обычно зависят от периодической замены картриджей, содержащих терапевтическое средство, подлежащее инфузии. При замене картриджа в такой насосной системе может происходить временное прерывание, в ином случае непрерывного, потока терапевтического средства в организм пациента. В таком случае фаза введения перед заменой картриджа и фаза введения после замены картриджа по-прежнему будут подпадать в определение фармацевтических средств и способов по настоящему

изобретению, составляющих вместе одно "непрерывное введение" такого терапевтического средства.

Продолжительное или непрерывное введение конструкций на основе антитела по настоящему изобретению может быть внутривенным или подкожным, и осуществляться посредством устройства для доставки жидкости или небольшой насосной системы, включающей механизм подачи жидкости для подачи жидкости из резервуара и приводной механизм для приведения в действие механизма подачи. Насосные системы для подкожного введения могут включать иглу или канюлю для пронизывания кожи пациента и доставки подходящей композиции в организм пациента. Указанные насосные системы могут быть непосредственно зафиксированы или прикреплены к коже пациента независимо от расположения вен, артерий и кровеносных сосудов, за счет чего обеспечивается непосредственный контакт между насосной системой и кожей пациента. Насосная система может быть прикреплена к коже пациента в течение от 24 часов до нескольких дней. Насосная система может иметь небольшой размер с резервуаром для небольших объемов. В качестве неограничивающего примера объем резервуара для подходящей фармацевтической композиции, подлежащей введению, может составлять от 0,1 до 50 мл.

Продолжительное введение также может осуществляться трансдермальным путем посредством пластыря, носимого на коже и заменяемого через определенные интервалы времени. Специалисту в данной области техники известны подходящие для этой цели системы на основе пластырей для доставки лекарственного средства. Следует отметить, что трансдермальное введение особенно подходит для непрерывного введения, поскольку замену первого использованного пластыря преимущественно можно осуществлять одновременно с размещением нового второго пластыря, например, на поверхности кожи, непосредственно вблизи первого использованного пластыря и непосредственно перед удалением первого использованного пластыря. Проблем с прерыванием потока или отказом элемента питания не возникает.

Если фармацевтическая композиция была лиофилизирована, то лиофилизированный материал сначала восстанавливают в соответствующей жидкости перед введением. Лيوфилизированный материал можно восстанавливать, например, в бактериостатической воде для инъекций (BWFI), физиологическом солевом растворе, фосфатно-солевом буфере (PSB) или в том же составе, в котором белок находился перед лиофилизацией.

Композиции по настоящему изобретению можно вводить субъекту в подходящей дозе, которую можно определить, например, с помощью исследований с повышением дозы путем введения возрастающих доз описанной в данном документе конструкции на основе антитела по настоящему изобретению, демонстрирующей межвидовую специфичность, отличным от шимпанзе приматам, например, макакам. Как указано выше, описанную в данном документе конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению, демонстрирующую межвидовую специфичность, преимущественно можно использовать в идентичной форме в доклинических исследованиях на отличных от шимпанзе приматах и в качестве лекарственного средства на людях. Схема приема будет определяться лечащим

врачом и клиническими факторами. Как хорошо известно в области медицины, дозировки в случае каждого пациента зависят от множества факторов, в том числе от размеров тела, площади поверхности тела, возраста пациента, конкретного соединения, подлежащего введению, пола, времени и пути введения, общего состояния здоровья и других лекарственных средств, вводимых совместно.

Термин "эффективная доза" или "эффективная дозировка" определяется как количество, достаточное для достижения или по меньшей мере частичного достижения требуемого эффекта. Термин "терапевтически эффективная доза" определяется как количество, достаточное для излечения или по меньшей мере частичного прекращения заболевания и его осложнений у пациента, который уже страдает от данного заболевания. Количества или дозы, эффективные для данного применения, будут зависеть от состояния, подлежащего лечению (показания), доставляемой конструкции на основе антитела, терапевтического контекста и целей, тяжести заболевания, предшествующей терапии, истории болезни пациента и реакции на терапевтическое средство, пути введения, размера (вес тела, площадь поверхности тела или размер органа) и/или состояния (возраст и общее состояние здоровья) пациента, а также общего состояния собственной иммунной системы пациента. Точную дозу можно корректировать в соответствии с решением лечащего врача так, чтобы ее можно было вводить пациенту за один раз или посредством серии введений и с целью получения оптимального терапевтического эффекта.

Типичная дозировка может находиться в диапазоне от приблизительно 0,1 мкг/кг до приблизительно 30 мг/кг или более в зависимости от вышеупомянутых факторов. В специфических вариантах осуществления дозировка может находиться в диапазоне от 1,0 мкг/кг до приблизительно 20 мг/кг, необязательно от 10 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от 100 мкг/кг до приблизительно 5 мг/кг.

Терапевтически эффективное количество конструкции на основе антитела по настоящему изобретению предпочтительно приводит к снижению тяжести симптомов заболевания, повышению частоты или длительности бессимптомных периодов заболевания или предупреждению патологии или недееспособности вследствие поражения заболеванием. В случае лечения опухолей, экспрессирующих антиген клетки-мишени, терапевтически эффективное количество конструкции на основе антитела по настоящему изобретению, например, конструкции на основе антитела к антигену клетки-мишени/CD3, предпочтительно ингибирует рост клеток или рост опухоли на по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80% или по меньшей мере приблизительно 90% относительно пациентов, не подвергавшихся лечению. Способность соединения ингибировать рост опухоли можно оценить на животной модели, прогностической в отношении эффективности.

Фармацевтическую композицию можно вводить в виде единственного терапевтического средства или, при необходимости, в комбинации с дополнительными

средствами терапии, такими как средства противораковой терапии, например, с другими белковыми и небелковыми лекарственными средствами. Эти лекарственные средства можно вводить одновременно с композицией, содержащей конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению, определенную в данном документе, или отдельно, до или после введения указанной конструкции на основе антитела в определенные временные интервалы и в определенных дозах.

Применяемый в данном документе термин "эффективная и нетоксичная доза" относится к переносимой дозе конструкции на основе антитела по настоящему изобретению, которая является достаточно высокой для того, чтобы вызвать истощение патологических клеток, устранение опухоли, уменьшение размеров опухоли или стабилизацию заболевания без значительных токсических эффектов или фактически без них. Такие эффективные и нетоксичные дозы можно определить, например, с помощью исследований с повышением дозы, описанных в данной области техники, и они должны быть ниже дозы, индуцирующей серьезные нежелательные побочные явления (дозолимитирующая токсичность, DLT).

Применяемый в данном документе термин "токсичность" относится к токсическим эффектам лекарственного средства, проявляющимся в виде нежелательных явлений или серьезных нежелательных явлений. Эти побочные явления могут относиться к отсутствию переносимости лекарственного средства в целом и/или отсутствию местной переносимости после введения. Токсичность также может включать тератогенное или канцерогенное действие, вызываемое лекарственным средством.

Применяемый в данном документе термин "безопасность", "in vivo безопасность" или "переносимость" определяет введение лекарственного средства без индукции серьезных нежелательных явлений непосредственно после введения (местная переносимость) и в течение более длительного периода применения лекарственного средства. "Безопасность", "in vivo безопасность" или "переносимость" можно оценивать, например, через равные промежутки времени в ходе периода лечения и последующего наблюдения. Измерения включают клиническую оценку, например, проявления во внутренних органах, и скрининг в отношении отклонений лабораторных показателей от нормы. Можно проводить клиническую оценку и записывать/кодировать отклонения от нормальных результатов в соответствии со стандартами NCI-CTC и/или MedDRA. Проявления во внутренних органах могут включать такие критерии, как аллергия/иммунология, кровь/костный мозг, сердечная аритмия, коагуляция и т. п., приведенные, например, в общих терминологических критериях для нежелательных явлений v3.0 (CTCAE). Лабораторные параметры, которые можно тестировать, включают, например, гематологические показатели, клиническую биохимию, профиль коагуляции и анализ мочи, а также исследование других жидкостей организма, таких как сыворотка крови, плазма крови, лимфатическая или спинномозговая жидкость, ликвор и т. п. Таким образом, безопасность можно оценить, например, посредством физикального осмотра, методик визуализации (т. е. ультразвукового исследования, рентгеновского исследования,

СТ-сканирования, магнитно-резонансной томографии (MRI), других измерений с помощью технических устройств (т. е. электрокардиограммы), показателей жизнедеятельности, путем измерения лабораторных параметров и записи нежелательных явлений. Например, нежелательные явления у отличных от шимпанзе приматов в путях применения и способах по настоящему изобретению можно исследовать с помощью гистопатологических и/или гистохимических способов.

Вышеуказанные термины также перечислены, например, в Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals S6; ICH Harmonised Tripartite Guideline; ICH Steering Committee meeting on July 16, 1997.

И наконец, в настоящем изобретении предусмотрен набор, содержащий конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению или полученную в соответствии со способом по настоящему изобретению, фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, полинуклеотид по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению и/или клетку-хозяина по настоящему изобретению.

В контексте настоящего изобретения термин "набор" означает два или более компонентов, один из которых соответствует конструкции на основе антитела, фармацевтической композиции, вектору или клетке-хозяину по настоящему изобретению, упакованных вместе в контейнере, емкости или иным образом. Следовательно набор может описан как комплект продуктов и/или инструментов, достаточных для достижения определенной цели, которые могут продаваться как единое целое.

Набор может содержать одну или несколько емкостей (таких как флаконы, ампулы, контейнеры, шприцы, бутылки, пакеты) любых подходящих формы, размера и материала (предпочтительно, например, из водонепроницаемого пластика или стекла), содержащего конструкцию на основе антитела или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению в дозировке, подходящей для введения (см. выше). Набор может дополнительно содержать инструкции по применению (например, в виде информационного листка или инструкции-брошюры), средства для введения конструкции на основе антитела по настоящему изобретению, такие как шприц, насос, инфузионная система и т. п., средства для восстановления конструкции на основе антитела по настоящему изобретению и/или средства для разбавления конструкции на основе антитела по настоящему изобретению.

В настоящем изобретении также предусмотрены наборы с устройством для введения однократной дозы. Набор по настоящему изобретению также может содержать первую емкость, содержащую высушенную/лиофилизированную конструкцию на основе антитела, и вторую емкость, содержащую водный состав. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены наборы, содержащие однокамерные и многокамерные предварительно заполненные шприцы (например, шприцы с жидким или лиофилизированным содержимым).

Следует отметить, что применяемые в данном документе формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, например, ссылка на "реагент" включает один или несколько таких

различных реагентов, а ссылка на "способ" включает ссылку на эквивалентные стадии и способы, известные специалистам в данной области техники, которые можно модифицировать или использовать вместо способов, описанных в данном документе.

Если не указано иное, то термин "по меньшей мере", предшествующий серии элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в серии. Специалистам в данной области техники будут понятны или они будут способны определить посредством проведения только обычных экспериментов многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. Подразумевается, что такие эквиваленты включены в настоящее изобретение.

Термин "и/или", применяемый в любом месте в данном документе, включает значения "и", "или" и "все элементы или любая другая их комбинация, объединенные указанным термином".

Применяемый в данном документе термин "приблизительно" или "примерно" означает в пределах 20%, предпочтительно в пределах 10% и более предпочтительно в пределах 5% от заданной величины или диапазона. При этом он включает также конкретное число, например, приблизительно 20 включает 20.

Термин "меньше" или "больше" включает конкретное число. Например, меньше 20 означает меньше или равно. Аналогично более чем или больше означает более чем или равно или больше или равно соответственно.

На протяжении всего настоящего описания и нижеследующей формулы изобретения, если по контексту не требуется иное, слово "содержать" и его варианты, такие как "содержит" и "содержащий", будут пониматься как подразумевающие включение указанного целого числа или стадии, или группы целых чисел или стадий, но не исключение любого другого целого числа или стадии, или группы целых чисел или стадий. Термин "содержащий", при использовании в данном документе, можно заменить терминами "включающий" или "включающий в себя", или иногда, при использовании в данном документе, термином "имеющий".

Применяемый в данном документе "состоящий из" исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанный в элементе пункта формулы изобретения. Применяемый в данном документе термин "состоящий фактически из" не исключает материалы или стадии, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики пункта формулы изобретения.

В каждом случае в данном документе любой из терминов "содержащий", "состоящий фактически из" и "состоящий из" можно заменить любым из двух остальных терминов.

Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными методами, протоколами, материалами, реагентами и веществами и т. д., описанными в данном документе, и, следовательно, они могут варьироваться. Применяемая в данном документе терминология служит только для целей описания конкретных вариантов осуществления, и не подразумевает ограничения объема настоящего изобретения, который

определяется исключительно формулой изобретения.

Все публикации и патенты, упоминаемые на протяжении всего текста настоящего описания (включая все патенты, заявки на патенты, научные публикации, технические характеристики и инструкции от производителя и т. п.) выше или ниже, настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте. Все изложенное в данном документе не следует воспринимать как признание того, что данное изобретение не имеет права противопоставлять такое описание на основании более раннего изобретения. В тех случаях, когда включенный посредством ссылки материал противоречит или не согласуется с данным описанием, это описание имеет приоритет относительно любого такого материала.

Лучшее понимание настоящего изобретения и его преимуществ обеспечат следующие примеры, приведенные исключительно в иллюстративных целях. Подразумевается, что примеры не ограничивают объем данного изобретения каким-либо образом.

Пример 1. Сравнение режима периодического культивирования с подпиткой и непрерывного производства при получении конструкции на основе ViTE®-антитела к CD19 x CD3

Получении конструкции на основе ViTE®-антитела к CD19 x CD3 в способе периодического культивирования с подпиткой (FB)

Способ FB начинали с размораживания флакона, содержащего клетки яичника китайского хомячка (CHO), экспрессирующие конструкцию на основе ViTE®-антитела к CD19 x CD3. Во время наращивания биомассы клетки ресуспендировали в свежей селективной ростовой среде при целевой плотности жизнеспособных клеток (VCD). Объем культуры последовательно увеличивали во встряхиваемых колбах или биореакторах для создания количества клеточной массы, достаточного для инокуляции, в конечном итоге, в биореактор для получения путем периодического культивирования с подпиткой (масштаб 2 л или 500 л).

После инокуляции клеток в производственный биореактор при плотности клеток $1,5 \times 10^6$ клеток/мл культуру подпитывали определенным количеством проприетарной питательной среды с химически определенным составом в дни 2, 5, 7, 9, 11 и 13. Культуру поддерживали при pH 6,85, уровне растворенного кислорода 64 мм рт. ст. и 36°C, с температурным сдвигом до 33,5°C в приблизительно день 7. Плотность клеток (CDV, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс), метаболиты (NovaFlex, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс) и титр (HPLC-анализ) измеряли на протяжении всего времени культивирования. После 15 дней продуцирования проводили сбор и осветление посредством центрифугирования и фильтрации с получением собранной культуральной жидкости (HCCF), которую подвергали дальнейшей хроматографии с захватом с помощью белка-L, и элюат анализировали в отношении показателей качества продукта и связанных со способом примесей с применением аналитической катионообменной хроматографии (CEX-HPLC), пептидного картирования и ELISA для выявления белка клетки-хозяина (HCP).

Получение конструкции на основе ViTE®-антитела к CD19 x CD3 в способе непрерывного производства (СМ)

Перед началом способа СМ размораживали флакон, содержащий клетки СНО, экспрессирующие конструкцию на основе ViTE®-антитела к CD19 x CD3. Во время наращивания биомассы клетки ресуспендировали в свежей селективной ростовой среде при целевой плотности жизнеспособных клеток (VCD). Объем культуры последовательно увеличивали во встряхиваемых колбах или биореакторах для создания количества клеточной массы, достаточного для инокуляции, в конечном итоге, в продукционный биореактор для перфузионного культивирования (масштаб 10 л или 50 л).

После инокуляции клеток в продукционный биореактор при $0,7 \times 10^6$ клеток/мл происходила начальная фаза роста клеток в течение 12 дней для увеличения плотности и биомассы клеток до заданного значения, составляющего 70 пФ/см ($60-80 \times 10^6$ клеток/мл), как измерено с помощью емкостного зонда (Hamilton Bonaduz AG, Швейцария). Продукционный биореактор поддерживали при pH 6,85, уровне растворенного кислорода 64 мм рт. ст. и 36°C. Перфузионное культивирование начинали в день 4 фазы роста клеток с применением системы фильтрации с переменным тангенциальным потоком (ATF) (Refine Technologies, Ганновер, Нью-Джерси) с фильтрами из полиэфирсульфона с размером пор 0,2 мкм (GE Healthcare, Питтсбург, Пенсильвания) и проприетарной перфузионной средой с определенным химическим составом при скорости перфузии, составляющей 0,4 объема биореактора в день (VVD). Скорость перфузии увеличивали постепенно, например, от 0,4 VVD в день 4 до 2 VVD в день 12. После достижения заданного значения биомассы в день 12 температуру культуры клеток снижали до 33,5°C, начинали сбор НССФ (т. е. бесклеточного пермеата, содержащего конструкцию на основе ViTE®-антитела к CD19 x CD3) и перфузионное культивирование продолжали в течение 28 дополнительных дней путем подпитки при скорости перфузии 2 VVD (удельная скорость перфузии, CSPR, в стационарной фазе, составляющая 0,02-0,03 нл/клетка-день) и вымывания лишних клеток для поддержания заданного значения биомассы. Плотность клеток (CDV, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс), метаболиты (NovaFlex, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс) и титр пермеата (HPLC-анализ) измеряли на протяжении всего времени культивирования. НССФ собирали при комнатной температуре с интервалами 24 часа и подвергали дальнейшей хроматографии с захватом с помощью белка-L. Элюат из белка-L, например, в дни 26, 27, 34, 40, анализировали в отношении показателей качества продукта и связанных со способом примесей с применением аналитической катионообменной хроматографии (CEX-HPLC), пептидного картирования и ELISA для выявления НСР.

Характеристики культуры клеток (**фигура 2, таблица 4**), показатели качества продукта и уровни связанных со способом примесей (**таблица 4**) при получении конструкции на основе ViTE®-антитела к CD19 x CD3 в СМ были улучшены по сравнению с получением конструкции на основе ViTE®-антитела к CD19 x CD3 в способе FB. Более высокая объемная продуктивность, меньшая химическая и физическая деградация продукта и меньшее количество связанных со способом примесей были продемонстрированы при

получении конструкции на основе BiTE®-антитела к CD19 x CD3 в способе СМ на этапе накопления. Нормализованные значения, указанные в таблице 4, соответствуют среднему значению всех абсолютных чисел, разделенному на среднее значение всех абсолютных чисел при FB; в случае FB они соответствуют 1; в случае СМ представляют собой одно число, соответствующему описанному соотношению.

Способы анализа качества продукта

Катионообменная высокоэффективная хроматография для анализа заряженных вариантов (CEX-HPLC)

Разделение с помощью хроматографии со слабым катионообменником (CEX) проводили с применением колонки Thermo Scientific™ ProPac WCX-10 (4,0 × 250 мм, 10 мкм) и Agilent HPLC серии 1100. Образцы белка разбавляли до 22,5 мкг/мл с применением буфера для составления, а затем кондиционировали с помощью буфера на основе 2-(N-морфолино)этансульфона (MES) (pH 5,8) перед загрузкой и разделяли при установленной температуре 30°C с применением возрастающего градиента NaCl. Подвижная фаза А представляла собой 20 mM MES при pH 5,8, а подвижная фаза В представляла собой 20 mM MES и 1,0 M NaCl при pH 5,8. Линейный градиент выполнялся от 7% В до 54% В за 55 мин при скорости потока 0,5 мл/мин. Вводили приблизительно 1,5 мкг образца и сигнал отслеживали с помощью FL-детекции (возбуждение при 280 нм, излучение при 345 нм).

Триптическое пептидное картирование для выявления химических модификаций

Образцы белка конструкции на основе BiTE®-антитела к CD19 x CD3 расщепляли посредством способа на основе фильтра с применением устройства Millipore Microcon 30K. Образец белка вносили на фильтр, центрифугировали для удаления матрикса из образца, затем денатурировали в буфере на основе 6 M гидрохлорида гуанидина (GuHCl) (Thermo Fisher Scientific, Рокфорд, Иллинойс), содержащем метионин, восстанавливали с помощью 500 mM дитиотреитола (DTT) (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури), при 37°C в течение 30 мин и затем подвергали алкилированию посредством инкубации с 500 mM иодуксусной кислотой (IAA) (например, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури) в течение 20 мин в темноте при комнатной температуре. Непрореагировавшую IAA гасили с помощью добавления DTT. Все вышеперечисленные стадии происходили на фильтре. Затем в образцах проводили замену буфера на буфер для расщепления (50 mM Tris, pH 7,8, содержащий метионин) с помощью центрифугирования для удаления любых остаточных количеств DTT и IAA. Расщепление трипсином проводили на фильтре в течение 1 ч при 37°C с применением отношения фермента к белку 1:20 (вес/вес). Смесь, полученную в результате расщепления, собирали с помощью центрифугирования и затем гасили путем добавления 8 M GuHCl в ацетатном буфере при pH 4,7.

Анализ на основе жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LC-MS) проводили с применением системы для сверхэффективной жидкостной хроматографии (UPLC), Thermo U-3000, непосредственно сопряженной с масс-спектрометром Thermo Scientific Q-Exactive.

Продукты расщепления белков разделяли с помощью обращенной фазы с

применением колонки Agilent Zorbax C18 RR HD (2,1×150 мм, 1,8 мкм), при этом температуру колонки поддерживали на уровне 50°C. Подвижная фаза А состояла из 0,020% (объем/объем) муравьиной кислоты (FA) в воде, а подвижная фаза В представляла собой 0,018% (объем/объем) FA в ацетонитриле (I). В колонку вводили приблизительно 5 мкг расщепленной конструкции на основе BiTE®-антитела к CD19 x CD3. Для разделения пептидов применяли градиент (от 0,5 до 36% фазы В за 145 мин) при скорости потока, составляющей 0,2 мл/мин. Элюируемые пептиды отслеживали с помощью MS.

Для идентификации пептидов и анализа их модификаций использовали эксперимент с зависимой от данных tandemной MS (MS/MS). Получали полную сканограмму от 200 до 2000 масса/заряд в режиме положительных ионов, за которой следует 6 сканограмм при зависимой от данных MS/MS для идентификации последовательности пептида. Количественная оценка была основана на данных масс-спектрометрии выбранного отслеживания ионов с применением приведенного ниже уравнения:

$$\% \text{ модификации} = \frac{A_{\text{модифиц}}}{A_{\text{модифиц}} + A_{\text{немодифиц}}} \times 100$$

где % модификации представляет собой уровень модифицированных пептидов, $A_{\text{модифиц}}$ представляет собой область хроматограммы по выделенному иону для модифицированного пептида, $A_{\text{немодифиц}}$ представляет собой область хроматограммы по выделенному иону для немодифицированного пептида.

ELISA для выявления белка клетки-хозяина (HCP)

Микротитрационный планшет покрывают иммуноглобулином G кролика (IgG) к HCP (Amgen, полученное в лаборатории антитела). После того, как планшет промывают и блокируют, тестовые образцы, контроли и калибровочные стандарты HCP добавляют в планшет и инкубируют. Несвязавшиеся белки вымывают из планшета и в планшет добавляют объединенный IgG кролика к HCP, конъюгированный с биотином (Amgen, полученное в лаборатории антитела) и инкубируют. После еще одной промывки в планшет добавляют конъюгат Streptavidin™ с пероксидазой хрена (HRP-конъюгат) (Amersham-GE, Бакингемшир, Великобритания) и инкубируют. Планшет промывают в последний раз и в планшет добавляют хромогенный субстрат тетраметилбензидин (TMB) (Kirkegaard and Perry Laboratories, Гейтерсберг, Мэриленд). Проявление цвета останавливают с помощью 1 М фосфорной кислоты, и оптическую плотность измеряют с помощью спектрофотометра.

Таблица 4. Сравнение получения конструкции на основе BiTE®-антитела к CD19 x CD3 способом CM со способом FB с применением одной и той же линии клеток CHO, полученной от хозяина с GS-KO. IVCD понимается в данном документе и в контексте настоящего изобретения как интегрированная плотность жизнеспособных клеток.

Параметр способа	Получение	Получение
	конструкции на основе	конструкции на основе
	BiTE®-антитела к CD19 x CD3	BiTE®-антитела к CD19 x CD3

	в способе FB	в способе CM
Количественные показатели культуры клеток		
<i>4 цикла при 2 л и 1 цикл при 500 л в случае FB; 2 цикла при 10 л и 1 цикл при 50 л в случае CM. Представлены как абсолютные числа, так и нормализованные относительно FB (в скобках)</i>		
Продолжительность	15	40
продукционного	[1]	[2,67]
культивирования (дни)		
Конечная IVCD (10^6 клеток-	254,2	2298,3
день/мл)	[1]	[9,04]
Средняя продуктивность HCCF	0,31	5,07
(г/л объема биореактора)	[1]	[16,34]
Средняя суточная	20,8	129,0
продуктивность HCCF (мг/л	[1]	[6,21]
объема биореактора/день)		
Показатели качества продукта		
<i>В случае FB анализировали 2 образца элюата из хроматографии с захватом; в случае CM анализировали 4 образца элюата из хроматографии с захватом (дни 26, 27, 34, 40). Представлены как абсолютные числа, так и среднее значение, нормализованное относительно среднего значения для FB (в скобках)</i>		
Усеченные по гистидиновой		
метке разновидности в элюата из	28; 21	6; 6; 6; 6
хроматографии с захватом,	[1]	[0,24]
измеренные в кислотных пиках		
CEX-HPLC (%)		
Изомеризация D32, определенная		
путем пептидного картирования в	2,2; 2,0	0,6; 0,6; 0,8; 0,7
элюате из хроматографии с	[1]	[0,32]
захватом (%)		
Связанные со способом примеси		
<i>В случае FB анализировали 2 образца элюата из хроматографии с захватом; в случае CM анализировали 4 образца элюата из хроматографии с захватом (дни 26, 27, 34, 40). Представлены как абсолютные числа, так и среднее значение, нормализованное относительно среднего значения для FB (в скобках)</i>		
Белок клетки-хозяина в элюате из	885; 1292	185; 138; 145; 129

Пример 2. Сравнение режима периодического культивирования с подпиткой и непрерывного производства при получении конструкции на основе BiTE®-антитела к EGFRvIII x CD3

Получении конструкции на основе BiTE®-антитела к EGFRvIII x CD3 в способе периодического культивирования с подпиткой (FB)

Способ FB начинали с размораживания флакона, содержащего клетки CHO, экспрессирующие конструкцию на основе BiTE®-антитела к EGFRvIII x CD3. Во время наращивания биомассы клетки ресуспендировали в свежей селективной ростовой среде при целевой плотности жизнеспособных клеток (VCD). Объем культуры последовательно увеличивали во встряхиваемых колбах или биореакторах для создания количества клеточной массы, достаточного для инокуляции, в конечном итоге, в биореактор для получения путем периодического культивирования с подпиткой (масштаб 2 л).

После инокуляции клеток в производственный биореактор при плотности клеток $1,0 \times 10^6$ клеток/мл культуру подпитывали определенным количеством проприетарной среды с химически определенным составом в дни 3, 6 и 8. Культуру поддерживали при pH 6,9, постоянном уровне растворенного кислорода 64 мм рт. ст. и 36°C. Плотность клеток (CDV, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс), метаболиты (NovaFlex, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс) и титр (HPLC-анализ) измеряли на протяжении всего времени культивирования. После 12 дней продуцирования супернатант культуры клеток очищали с помощью аффинной хроматографии на иммобилизованных ионах металла (IMAC) и элюат анализировали в отношении показателей качества продукта с применением эксклюзионной хроматографии (SE-HPLC).

Получение конструкции на основе BiTE®-антитела к EGFRvIII x CD3 в способе непрерывного производства (CM)

Способу CM начинали с размораживания флакона, содержащего клетки CHO, экспрессирующие конструкцию на основе BiTE®-антитела к EGFRvIII x CD3. Во время наращивания биомассы клетки ресуспендировали в свежей селективной ростовой среде при целевой плотности жизнеспособных клеток (VCD). Объем культуры последовательно увеличивали во встряхиваемых колбах или биореакторах для создания количества клеточной массы, достаточного для инокуляции, в итоге, в производственный биореактор для перфузионного культивирования (масштаб 2 л).

После инокуляции клеток в производственный биореактор при $5-10 \times 10^6$ клеток/мл происходила начальная фаза роста клеток в течение приблизительно 6 дней для увеличения плотности и биомассы клеток до заданного значения, составляющего 80 пФ/см ($60-80 \times 10^6$ клеток/мл), как измерено с помощью емкостного зонда (Hamilton Bonaduz AG, Швейцария). Производственный биореактор поддерживали при pH 6,9, уровне растворенного кислорода 64 мм рт. ст. и 36°C. Перфузионное культивирование начинали приблизительно в день 1 фазы роста клеток с применением системы фильтрации с переменным тангенциальным потоком (ATF) (Refine Technologies, Ганновер, Нью-Джерси) с фильтрами из полиэфирсульфона с

размером пор 0,2 мкм (GE Healthcare, Питтсбург, Пенсильвания) и проприетарной перфузионной средой с определенным химическим составом при скорости перфузии, составляющей 0,5 VVD. Скорость перфузии увеличивали постепенно, например, от 0,5 VVD в день 1 до 2 VVD в день 4. После достижения заданного значения биомассы в приблизительно день 6 начинали сбор HCCF (т. е. бесклеточного пермеата, содержащего конструкцию на основе BiTE®-антитела к EGFRvIII x CD3) и перфузионное культивирование продолжали в течение 29 дополнительных дней путем подпитки при скорости перфузии 2 VVD (CSPR в стационарной фазе, составляющая 0,02-0,03 нл/клетка-день) и вымывания лишних клеток для поддержания заданного значения биомассы. Плотность клеток (CDV, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс), метаболиты (NovaFlex, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс) и титр пермеата (HPLC-анализ) измеряли на протяжении всего времени культивирования. Образцы пермеата, отобранные в дни 5, 10, 15, 20, 25, 30 и 35, очищали с помощью аффинной хроматографии на иммобилизованных ионах металла (IMAC) и элюат анализировали в отношении показателей качества продукта с применением эксклюзионной хроматографии (SE-HPLC). Нормализованные значения, указанные в таблице 5, соответствуют среднему значению всех абсолютных чисел, разделенному на среднее значение всех абсолютных чисел при FB; в случае FB они соответствуют 1; в случае CM представляют собой одно число, соответствующему описанному соотношению.

Характеристики культуры клеток (**фигура 3, таблица 5**) и показатели качества продукта (**таблица 5**) при получении конструкции на основе BiTE®-антитела к EGFRvIII x CD3 в способе CM были улучшены по сравнению с получением конструкции на основе BiTE®-антитела к EGFRvIII x CD3 в способе FB с применением одной и той же линии клеток CHO. В частности, более низкая концентрация пермеата в способе CM коррелировала с более низкими уровнями высокомолекулярных (HMW) разновидностей и более высоким содержанием мономера в продукте по сравнению со способом FB (**фигура 4**). Более высокая объемная продуктивность при меньшей физической деградации продукта были продемонстрированы при получении конструкции на основе BiTE®-антитела к EGFRvIII x CD3 в способе CM на этапе накопления.

Способы анализа качества продукта

Эксклюзионная хроматография-высокоэффективная жидкостная хроматография (SE-HPLC)

SE-HPLC проводили с применением колонки для эксклюзионной хроматографии Waters BEH200 (4,6×150 мм, 1,7 мкм) и системы Waters UHPLC. Образцы белка вводили в чистом виде и изократически разделяли с применением фосфатного буфера, содержащего соль NaCl (подвижная фаза представляла собой 100 mM фосфата натрия, 250 mM NaCl при pH 6,8), при скорости потока 0,4 мл/мин, и элюент отслеживали по поглощению УФ при 280 нм. Загружали приблизительно 6 мкг образца.

Таблица 5. Сравнение получения конструкции на основе BiTE®-антитела к EGFRvIII x CD3 способа CM со способом FB с применением одной и той же линии клеток

СНО, полученной от хозяина с дефицитом DHFR.

Параметр способа	Получение конструкции на основе BiTE®- антитела к EGFRvIII x CD3 Способ FB	Получения конструкции на основе BiTE®- антитела к EGFRvIIIxCD3 в способе CM
Количественные показатели культуры клеток		
2 цикла при 2 л в случае FB; 2 цикла при 2 л в случае CM. Представлены как абсолютные числа, так и нормализованные относительно FB (в скобках)		
Продолжительность продукционного культивирования (дни)	12 [1]	36 [2,96]
Конечная IVCD (10 ⁶ клеток-день/мл)	95,5 [1]	2013,5 [21,08]
Средняя продуктивность НССФ (г/л объема биореактора)	0,28 [1]	4,4 [15,97]
Средняя суточная продуктивность НССФ (мг/л объема биореактора/день)	22,96 [1]	124,0 [5,40]
Показатели качества продукта		
В случае FB анализировали 2 образца элюата из хроматографии с захватом; в случае CM анализировали 14 образцов элюата из хроматографии с захватом (дни 5, 10, 15, 20, 25, 30 и 35 из 2 циклов). Представлены как абсолютные числа, так и среднее значение, нормализованное относительно среднего значения для FB (в скобках)		
Содержание НМВ в элюате из хроматографии с захватом (%)	24,1; 23,4 [1]	6,6; 7,1; 8,5; 7,6; 5,8; 5,7; 2,6; 6,3; 8,9; 7,4; 8,4; 6,9; 6,7; 4,6 [0,28]

Пример 3. Сравнение режима периодического культивирования с подпиткой и непрерывного производства при получении биспецифического антитела к альфа-TNF x TL1A

Получение биспецифического антитела к альфа-TNF x TL1A в способе периодического культивирования с подпиткой (FB)

Способ FB начинали с размораживания флакона, содержащего клетки СНО, экспрессирующие (полноразмерное) биспецифическое антитело к альфа-TNF x TL1A. Во время наращивания биомассы клетки ресуспендировали в свежей селективной ростовой

среде при целевой плотности жизнеспособных клеток (VCD). Объем культуры последовательно увеличивали во встряхиваемых колбах или биореакторах для создания количества клеточной массы, достаточного для инокуляции, в конечном итоге, в биореактор для получения путем периодического культивирования с подпиткой (масштаб 2 л).

После инокуляции клеток в производственный биореактор при плотности клеток $1,0 \times 10^6$ клеток/мл культуру подпитывали определенным количеством проприетарной среды с химически определенным составом в дни 3, 6 и 8. Культуру поддерживали при pH 6,9, постоянном уровне растворенного кислорода 64 мм рт. ст. и 36°C . Плотность клеток (CDV, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс), метаболиты (NovaFlex, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс) и титр (HPLC-анализ) измеряли на протяжении всего времени культивирования. После 12 дней продуцирования проводили сбор и осветление посредством центрифугирования и фильтрации с получением собранной культуральной жидкости (HCCF), которую подвергали дальнейшей хроматографии с захватом с помощью белка-A, за которой следовала стадия хроматографии с сильным катионообменником (CEX) с элюированием с помощью градиента NaCl. Элюат из CEX анализировали в отношении показателей качества продукта и связанных со способом примесей с применением капиллярного электрофореза на геле с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях (RCE-SDS), аналитической катионообменной хроматографии (CEX-HPLC), пептидного картирования и ELISA для выявления белка клетки-хозяина (HCP).

Получение биспецифического антитела к TNF-альфа x TL1A в способе непрерывного производства (CM)

Способ CM начинали с размораживания флакона, содержащего клетки CHO, экспрессирующие биспецифическое антитело к альфа-TNF x TL1A. Во время наращивания биомассы клетки ресуспендировали в свежей селективной ростовой среде при целевой плотности жизнеспособных клеток (VCD). Объем культуры последовательно увеличивали во встряхиваемых колбах или биореакторах для создания количества клеточной массы, достаточного для инокуляции, в итоге, в производственный биореактор для перфузионного культивирования (масштаб 2 л).

После инокуляции клеток в производственный биореактор при 5×10^6 клеток/мл происходила начальная фаза роста клеток в течение 6 дней для увеличения плотности и биомассы клеток до заданного значения, составляющего 80 пФ/см ($60\text{--}80 \times 10^6$ клеток/мл), как измерено с помощью емкостного зонда (Hamilton Bonaduz AG, Швейцария). Производственный биореактор поддерживали при pH 6,9, уровне растворенного кислорода 64 мм рт. ст. и 36°C . Перфузионное культивирование начинали в день 1 фазы роста клеток с применением системы фильтрации с переменным тангенциальным потоком (ATF) (Refine Technologies, Ганновер, Нью-Джерси) с фильтрами из полиэфирсульфона с размером пор 0,2 мкм (GE Healthcare, Питтсбург, Пенсильвания) и проприетарной перфузионной средой с определенным химическим составом при скорости перфузии, составляющей 0,5 VVD. Скорость перфузии увеличивали постепенно, например, от 0,5 VVD в день 1 до 2 VVD в

день 6. После достижения заданного значения биомассы в день 6 начинали сбор НССФ (т. е. бесклеточного пермеата, содержащего конструкцию на основе биспецифического антитела к TNF-альфа x TL1A) и перфузионное культивирование продолжали в течение 28 дополнительных дней путем подпитки при скорости перфузии 2 VVD (CSPR в стационарной фазе, составляющая 0,02-0,03 нл/клетка-день) и вымывания лишних клеток для поддержания заданного значения биомассы. Плотность клеток (CDV, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс), метаболиты (NovaFlex, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс) и титр пермеата (HPLC-анализ) измеряли на протяжении всего времени культивирования. НССФ собирали от дня 8 до дня 10 и от дня 29 до дня 31 и подвергали дальнейшей хроматографии с захватом с помощью белка-A, а затем стадии хроматографии с сильным катионообменником (CEX) с элюированием с помощью градиента NaCl. Элюат из CEX анализировали в отношении показателей качества продукта и связанных со способом примесей с применением капиллярного электрофореза на геле с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях (RCE-SDS), аналитической катионообменной хроматографии (CEX-HPLC), пептидного картирования и ELISA для выявления белка клетки-хозяина (HCP). Нормализованные значения, указанные в таблице 6, соответствуют среднему значению всех абсолютных чисел, разделенному на среднее значение всех абсолютных чисел при FB; в случае FB они соответствуют 1; в случае CM представляют собой одно число, соответствующему описанному соотношению.

Характеристики культуры клеток (**фигура 5, таблица 6**), показатели качества продукта и уровни связанных со способом примесей (**таблица 6**) при получении биспецифического антитела к альфа-TNF x TL1A в способе CM были улучшены по сравнению с получением биспецифического антитела к альфа-TNF x TL1A в способе FB. Более высокая объемная продуктивность, меньшая химическая и физическая деградация продукта и меньшее количество связанных со способом примесей были продемонстрированы при получении биспецифического антитела к TNF-альфа x TL1A в способе CM на этапе накопления.

Способы анализа качества продукта

Катионообменная высокоэффективная хроматография для анализа заряженных вариантов (CEX-HPLC)

Разделение посредством хроматографии с сильным катионообменником (CEX) проводили с применением колонки YMC-BioPro SP-F; 100×4,6 мм I.D; 5 мкм, и Agilent HPLC серии 1100. Образцы белка разбавляли до 3,0 мг/мл с применением подвижной фазы А перед загрузкой и разделяли при установленной температуре 25°C с применением возрастающего градиента NaCl. Подвижная фаза А представляла собой 20 mM фосфата натрия при pH 6,9, и подвижная фаза В представляла собой 20 mM фосфата натрия и 0,5 M NaCl при pH 6,9. Линейный градиент выполнялся от 2% В до 25% В за 10 мин при скорости потока 0,6 мл/мин. Вводили приблизительно 90 мкг образца и сигнал отслеживали с помощью УФ-детекции при 280 нм.

Капиллярный электрофорез на геле с додецилсульфатом натрия в

восстанавливающих условиях (RCE-SDS)

CE-SDS в восстанавливающих условиях проводили с помощью системы Beckman Coulter ProteomeLab PA800 PLUS CE. Образцы белка разбавляли водой до 0,5 мг/мл и затем восстанавливали с помощью β -меркаптоэтанола (β -ME) в буфере для образца Beckman SDS при 70°C в течение 10 мин (Beckman Coulter, Брея, Калифорния). Образцы восстановленного и денатурированного белка вводили электрокинетически (5 кВ в течение 20 с) в капилляр из плавленого кремния без покрытия (ID 50 мкм x эффективная длина 30,0 см), разделяли с применением буфера для геля с SDS (разделение при 15 кВ в течение 30 мин) и проводили детекцию результата с применением УФ при 220 нм с помощью матричного фотодиодного детектора.

Триптическое пептидное картирование

Образец белка биспецифического антитела к альфа-TNF x TL1A разводили в воде до рабочего объема с концентрацией 3 мг/мл, затем денатурировали в буфере на основе 4 M GuHCl, содержащем этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA), восстанавливали с помощью 500 mM DTT при 37°C в течение 30 минут, а затем алкилировали посредством инкубации с 500 mM IAA в течение 20 минут в темноте при комнатной температуре. Непрореагировавшую IAA гасили с помощью добавления DTT. Образцы обессоливали и проводили замену буфера на буфер для расщепления (50 mM Tris, pH 7,8, содержащий метионин) в колонке NAP-5 под действием гравитационного течения (GE Healthcare, Великобритания). Расщепление трипсином проводили при соотношении 1:10 и инкубировали при 37°C в течение 35 минут. Расщепление останавливали с применением 10% муравьиной кислоты.

Анализ на основе жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LC-MS) проводили с применением устройства Waters Acquity, оснащенного насосом для двухкомпонентных смесей, отсеком для нагревания колонки, автоинжектором и автоматическим пробоотборником с контролем температуры, непосредственно сопряженного с масс-спектрометром Thermo-Scientific Q-Exactive Plus.

Продукты расщепления белков разделяли с помощью обращенной фазы с применением колонки Agilent Zorbax C18 RR HD (2,1×150 мм, 1,8 мкм), при этом температуру колонки поддерживали при 50°C. Подвижная фаза А состояла из 0,1% муравьиной кислоты в воде, а подвижная фаза В представляла собой 0,1% муравьиную кислоту в ацетонитриле. Для разделения пептидов применяли градиент (от 1% до 36% фазы В за 79 минут) при скорости потока, составляющей 0,25 мл/мин. Элюируемые пептиды отслеживали с помощью MS.

Для идентификации пептидов и анализа их модификаций использовали эксперимент с зависимой от данных tandemной MS (MS/MS). Получали полную сканограмму от 200 до 2000 масса/заряд в режиме положительных ионов, за которой следует 8 сканограмм при зависимой от данных MS/MS для идентификации последовательности пептида. Количественная оценка была основана на данных масс-спектрометрии выбранного отслеживания ионов с применением приведенного ниже уравнения:

$$\% \text{ модификации} = \frac{A_{\text{модифиц}}}{A_{\text{модифиц}} + A_{\text{немодифиц}}} \times 100$$

где % модификации представляет собой уровень модифицированных пептидов, $A_{\text{модифиц}}$ представляет собой область хроматограммы по выделенному иону для модифицированного пептида, $A_{\text{немодифиц}}$ представляет собой область хроматограммы по выделенному иону для немодифицированного пептида.

ELISA для выявления белка клетки-хозяина (HCP)

Микротитрационный планшет покрывают иммуноглобулином G кролика (IgG) к HCP (Amgen, полученное в лаборатории антитело). После того, как планшет промывают и блокируют, тестовые образцы, контроли и калибровочные стандарты HCP добавляют в планшет и инкубируют. Несвязавшиеся белки вымывают из планшета и в планшет добавляют объединенный IgG кролика к HCP, конъюгированный с биотином (Amgen, полученное в лаборатории антитело) и инкубируют. После еще одной промывки в планшет добавляют конъюгат Streptavidin™ с пероксидазой хрена (HRP-конъюгат) (Amersham-GE, Бакингемшир, Великобритания) и инкубируют. Планшет промывают в последний раз и в планшет добавляют хромогенный субстрат тетраметилбензидин (TMB) (Kirkegaard and Permy Laboratories, Гейтерсберг, Мэриленд). Проявление цвета останавливают с помощью 1 М фосфорной кислоты, и оптическую плотность измеряют с помощью спектрофотометра.

Таблица 6. Сравнение получения биспецифического антитела к альфа-TNF x TL1A способа CM со способом FB с применением одной и той же линии клеток CHO, полученной от хозяина с дефицитом DHFR

Параметр способа	Получение биспецифического антитела к TNF- альфа x TL1A в способе FB	Получение биспецифического антитела к TNF- альфа x TL1A в способе CM
Количественные показатели культуры клеток		
<i>2 цикла при 2 л в случае FB; 2 цикла при 2 л в случае CM. Представлены как абсолютные числа, так и нормализованные относительно FB (в скобках)</i>		
Продолжительность продукционного культивирования (дни)	12 [1]	35 [2,92]
Конечная IVCD (10 ⁶ клеток-день/мл)	125,0 [1]	1729,0 [13,83]
Средняя продуктивность HCCF (г/л объема биореактора)	2,93 [1]	49,1 [16,74]
Средняя суточная продуктивность HCCF (г/л объема биореактора/день)	0,25 [1]	1,41 [5,70]

Показатели качества продукта

В случае FB анализировали один очищенный пул (очистка с помощью белка-A и CEX); в случае CM анализировали 2 очищенных пула (очистка с помощью белка-A и CEX) (собранные от дня 8 по день 10 и от дня 29 по день 31 в культуре клеток). Представлены как абсолютные числа, так и среднее значение, нормализованное относительно среднего значения для FB (в скобках)

Усеченные по CDR разновидности, определенные с помощью RCE-SDS в элюате CEX (%)	1,2 [1]	0,3; 0,3 [0,25]
Пик кислотных разновидностей, определенный с помощью CEX-HPLC в элюате CEX (%)	16,5 [1]	9,3; 11,3 [0,62]
Дезамидирование Fc, определенное по пептидному картированию в элюате CEX (%)	0,6 [1]	0,1; 0,1 [0,17]

Связанные со способом примеси

В случае FB анализировали один очищенный пул (очистка с помощью белка-A и CEX); в случае CM анализировали 2 очищенных пула (очистка с помощью белка-A и CEX) (собранные от дня 8 по день 10 и от дня 29 по день 31 в культуре клеток). Представлены как абсолютные числа, так и среднее значение, нормализованное относительно среднего значения для FB (в скобках)

Белок клетки-хозяина в элюате из CEX (ppm)	253 [1]	66; 63 [0,25]
--	------------	------------------

Пример 4. Сравнение режима периодического культивирования с подпиткой и непрерывного производства при получении конструкции на основе ViTE®-антитела к CD33 x CD3

Получении конструкции на основе ViTE®-антитела к CD33 x CD3 в способе периодического культивирования с подпиткой (FB)

Способ FB начинали с размораживания флакона, содержащего клетки CHO (клон А), экспрессирующие конструкцию на основе ViTE®-антитела к CD33 x CD3. Во время наращивания биомассы клетки ресуспендировали в свежей селективной ростовой среде при целевой плотности жизнеспособных клеток (VCD). Объем культуры последовательно увеличивали во встряхиваемых колбах или биореакторах для создания количества клеточной массы, достаточного для инокуляции, в конечном итоге, в биореактор для получения путем периодического культивирования с подпиткой (масштаб 2 л).

После инокуляции клеток в продукционный биореактор при плотности клеток

$1,0 \times 10^6$ клеток/мл культуру подпитывали определенным количеством проприетарной среды с химически определенным составом в дни 3, 6, 8 и 10. Культуру поддерживали при pH 6,9, постоянном уровне растворенного кислорода 64 мм рт. ст. и 36°C . Плотность клеток (CDV, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс), метаболиты (NovaFlex, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс) и титр (HPLC-анализ) измеряли на протяжении всего времени культивирования. После 12 дней продуцирования супернатант культуры клеток очищали с помощью аффинной хроматографии на иммобилизованных ионах металла (IMAC) и элюат анализировали в отношении показателей качества продукта с применением эксклюзионной хроматографии (SE-HPLC).

Получение конструкции на основе BiTE®-антитела к CD33 x CD3 в способе непрерывного производства (CM)

Способ CM начинали с размораживания флакона, содержащего клетки CHO, экспрессирующие конструкцию на основе BiTE®-антитела к CD33 x CD3. Во время наращивания биомассы клетки ресуспендировали в свежей селективной ростовой среде при целевой плотности жизнеспособных клеток (VCD). Объем культуры последовательно увеличивали во встряхиваемых колбах или биореакторах для создания количества клеточной массы, достаточного для инокуляции, в итоге, в производственный биореактор для перфузионного культивирования (масштаб 2 л).

Клетки инокулировали в производственный биореактор при 1×10^6 клеток/мл и исследовали четыре последующие стадии перфузионного культивирования при увеличении заданных значений биомассы (**таблица 7**), как измерено с помощью емкостного зонда (Hamilton Bonaduz AG, Швейцария). Производственный биореактор поддерживали при pH 6,9, уровне растворенного кислорода 64 мм рт. ст. и 36°C . Перфузионное культивирование начинали в день 3 с использованием системы фильтрации с переменным тангенциальным потоком (ATF) (Refine Technologies, Ганновер, Нью-Джерси) с фильтрами из полиэфирсульфона с отсечением по размеру 750 кДа (GE Healthcare, Питтсбург, Пенсильвания) и проприетарной перфузионной средой с определенным химическим составом при скорости перфузии, составляющей 1 VVD. Скорость перфузии поддерживали на постоянном уровне 1 VVD в течение всей продолжительности перфузионного культивирования, тогда как заданные значения биомассы постепенно увеличивали для достижения четырех различных CSPR (**таблица 7**). В день 4 начинали сбор HCCF (т. е. бесклеточного пермеата, содержащего конструкцию на основе BiTE® антитела к CD33 x CD3), и перфузионное культивирование продолжали до дня 25 с помощью подпитки при скорости перфузии 1 VVD и вымывания лишних клеток для поддержания четырех заданных значений биомассы соответственно. Плотность клеток (CDV, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс), метаболиты (NovaFlex, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс) и титр пермеата (HPLC-анализ) измеряли на протяжении всего времени культивирования. Образцы пермеата очищали с помощью аффинной хроматографии на иммобилизованных ионах металла (IMAC) и элюат анализировали в отношении показателей качества продукта с применением эксклюзионной хроматографии (SE-HPLC).

Концентрация продукта при получении конструкции на основе BiTE®-антитела к CD33 x CD3 в способе CM была ниже, чем при получении конструкции на основе BiTE®-антитела к CD33 x CD3 в способе получения FB (**фигура 6**). Увеличение VCD при CM увеличивало концентрацию продукта и объемную продуктивность, измеряемые по суточной массе мономера (**таблица 8**). Однако более низкая концентрация продукта коррелировала с более высокими уровнями мономера и более низким содержанием HMW (**фигура 7 и 8**). Эта корреляция обнаружена у нескольких продуктов BiTE (**фигура 9**). Более того, более высокие удельные скорости перфузии и соответствующая более низкая концентрация продукта коррелировали с уменьшением агрегации конструкции на основе BiTE®-антитела к CD33 x CD3. Чтобы максимально увеличить как процент мономера, так и суточную массу мономера при увеличении VCD можно применять более высокую скорость перфузии, составляющую 6,4 VVD, и VCD, составляющую $64,8 \times 10^6$ клеток/мл (**таблица 7**).

Способы анализа качества продукта

Эксклюзионная хроматография-высокоэффективная жидкостная хроматография (SE-HPLC)

SE-HPLC проводили с применением колонки для эксклюзионной хроматографии Waters BEH200 (4,6×150 мм, 1,7 мкм) и системы Waters UHPLC. Образцы белка вводили в чистом виде и изократически разделяли с применением фосфатного буфера, содержащего соль NaCl (подвижная фаза представляла собой 100 mM фосфата натрия, 250 mM NaCl при pH 6,8), при скорости потока 0,4 мл/мин, и элюент отслеживали по поглощению УФ при 280 нм. Загружали приблизительно 6 мкг образца.

Таблица 7. Условия способа получения конструкции на основе BiTE®-антитела к CD33 x CD3 в способах FB и CM с применением одной и той же линии клеток CHO, полученной от хозяина с GS-KO

Название способа получения конструкции на основе BiTE®- антитела к CD33 x CD3	Тип способа	Целевая биомасса (пФ/см)	Средняя VCD (10^6 клеток/мл)	Скорость перфузии (VVD)	CSPR (нл/клетка -день)
Периодическое культивировани е с подпиткой	Периодическое культивировани е с подпиткой	Не применим	Не применим	Не применим	Не применимо
CM-A	Перфузия	10	12,8	1	0,078
CM-B	Перфузия	35	32,0	1	0,031

CM-C	Перфузия	60	49,2	1	0,020					
CM-D	Перфузия	80	64,8	1	0,015					
Способ	VCD (е6 клеток/мл)	Скорость перфузии (VVD)	CSPR (нл/клетка- день)	Титр на D12 FB	Суточ- ный титр (г/л)	Содер- жание моно- мера (%)	Концен- трация мономера (титр x % мономера) (г/л)	Объем HSCF в D12	Суточный объем HSCF (объем биореак- тора/день)	Суточная масса мономера на 1 объем BR (г/день)
FB	N/A	N/A	N/A	1,25	N/A	39	0,49	1	N/A	0,04
CM-A	12,8	1,0	0,078	N/A	0,08	70	0,06	N/A	0,3	0,02
CM-B	32,0	1,0	0,031	N/A	0,18	61	0,11	N/A	0,4	0,04
CM-C	49,2	1,0	0,020	N/A	0,35	52	0,18	N/A	0,6	0,10
CM-D	64,8	1,0	0,015	N/A	0,53	44	0,23	N/A	0,9	0,20
CM с высоким содер- жаньем мономера и высоким значением VCD [#]	64,8	6,4	0,100	N/A	0,08	70	0,06	N/A	6,3	0,37

Таблица 8. Расчеты продуктивности содержания мономера при получении конструкции на основе ViTE®-антитела CD33 x CD3 в способах FB и CM с применением одной и той же линии клеток CHO, полученной от хозяина с GS-KO

Продуктивность, рассчитанная на основании того же содержания мономера в продукте как в CM-A и того же титра как в CM-D, разделенного на 6,4; N/A=не применимо.

Пример 5. Дополнительное сравнение режима периодического культивирования с подпиткой и непрерывного производства при получении конструкции на основе ViTE®-антитела к CD33 x CD3

Получение конструкции на основе ViTE-антитела к CD33 x CD3 в способе периодического культивирования с подпиткой (FB)

Способ FB начинали с размораживания флакона, содержащего клетки яичника китайского хомячка (CHO), экспрессирующие конструкцию на основе ViTE® антитела к CD33 x CD3 (клон B). Во время наращивания биомассы клетки ресуспендировали в свежей селективной ростовой среде при целевой плотности жизнеспособных клеток (VCD). Объем культуры последовательно увеличивали во встряхиваемых колбах или биореакторах для создания количества клеточной массы, достаточного для инокуляции, в конечном итоге, в биореактор для получения путем периодического культивирования с подпиткой (масштаб 3 л).

После инокуляции клеток в производственный биореактор при плотности клеток $0,8 \times 10^6$ клеток/мл культуру подпитывали определенным количеством проприетарной среды с химически определенным составом в дни 3, 6 и 8. Культуру поддерживали при pH 6,9, уровне растворенного кислорода 48 мм рт. ст. и 36°C. Плотность клеток (CDV, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс), метаболиты (NovaFlex, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс) и титр (HPLC-анализ) измеряли на протяжении всего времени культивирования. В конце продуцирования проводили сбор и осветление с получением собранной культуральной жидкости (HCCF), которую подвергали дальнейшей хроматографии с захватом с помощью белка-L, и элюат анализировали в отношении показателей качества продукта с применением эксклюзионной хроматографии (SE-HPLC).

[375] Получение конструкции на основе ViTE®-антитела к CD33 x CD3 в способе непрерывного производства (CM)

Способ CM начинали с размораживания флакона, содержащего клетки CHO, экспрессирующие конструкцию на основе ViTE®-антитела к CD33 x CD3 (клон B). Во время наращивания биомассы клетки ресуспендировали в свежей селективной ростовой среде при целевой плотности жизнеспособных клеток (VCD). Объем культуры последовательно увеличивали во встряхиваемых колбах или биореакторах для создания количества клеточной массы, достаточного для инокуляции, в конечном итоге, в производственный биореактор для перфузионного культивирования (масштаб 3 л).

После инокуляции клеток в производственный биореактор при $0,7 \times 10^6$ клеток/мл происходила начальная фаза роста клеток в течение 12 дней для увеличения плотности и биомассы клеток до заданного значения, составляющего 70 пФ/см ($70-90 \times 10^6$ клеток/мл),

как измерено с помощью емкостного зонда (Hamilton Bonaduz AG, Швейцария). Продукционный биореактор поддерживали при pH 6,85, уровне растворенного кислорода 64 мм рт. ст. и 36°C. Перфузионное культивирование начинали в день 4 фазы роста клеток с применением системы фильтрации с переменным тангенциальным потоком (ATF) (Refine Technologies, Ганновер, Нью-Джерси) с фильтрами из полиэфирсульфона с размером пор 0,2 мкм (GE Healthcare, Питтсбург, Пенсильвания) и проприетарной перфузионной средой с определенным химическим составом при скорости перфузии, составляющей 0,5 объема биореактора в день (VVD). Скорость перфузии увеличивали постепенно, например, от 0,5 VVD в день 4 до 1,8 VVD в день 8. После достижения заданного значения биомассы температуру культуры клеток снижали до 33,0°C, в день 12 начинали сбор HCCF (т. е. бесклеточного пермеата, содержащего конструкцию на основе BiTE®-антитела к CD33 x CD3) и перфузионное культивирование продолжали в течение 30 дополнительных дней путем подпитки при скорости перфузии 2 VVD (удельная скорость перфузии, CSPR, в стационарной фазе, составляющая 0,02-0,03 нл/клетка-день) и вымывания лишних клеток для поддержания заданного значения биомассы. Плотность клеток (CDV, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс), метаболиты (NovaFlex, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс) и титр пермеата (HPLC-анализ) измеряли на протяжении всего времени культивирования. HCCF собирали при комнатной температуре с интервалами 24 часа и подвергали дальнейшей хроматографии с захватом с помощью белка-L. Элюат из белка-L анализировали в отношении характеристик качества продукта с применением эксклюзионной хроматографии (SE-HPLC). Нормализованные значения, указанные в таблице 9, соответствуют среднему значению всех абсолютных чисел, разделенному на среднее значение всех абсолютных чисел при FB; в случае FB они соответствуют 1; в случае CM представляют собой одно число, соответствующему описанному соотношению.

Характеристики культуры клеток (**фигура 10, таблица 9**) и уровни показателей качества продукта (**фигура 11, таблица 9**) при получении конструкции на основе BiTE®-антитела к CD33 x CD3 в способе CM были улучшены по сравнению с получением конструкции на основе BiTE®-антитела к CD33 x CD3 в способе FB. Более высокая объемная продуктивность, меньшая химическая и физическая деградация продукта были продемонстрированы при получении конструкции на основе BiTE®-антитела к CD33 x CD3 в способе CM на этапе накопления.

Способы анализа качества продукта

Эксклюзионная хроматография-высокоэффективная жидкостная хроматография (SE-HPLC)

SE-HPLC проводили с применением колонки для эксклюзионной хроматографии Waters BEH200 (4,6×150 мм, 1,7 мкм) и системы Waters UHPLC. Образцы белка вводили в чистом виде и изократически разделяли с применением фосфатного буфера, содержащего соль NaCl (подвижная фаза представляла собой 100 mM фосфата натрия, 250 mM NaCl при pH 6,8), при скорости потока 0,4 мл/мин, и элюент отслеживали по поглощению УФ при 280 нм. Загружали приблизительно 6 мкг образца.

Таблица 9. Сравнение получения конструкции на основе BiTE®-антитела к CD33 х CD3 в способе СМ со способом FB с применением одной и той же линии клеток CHO (клон В), полученной от хозяина с GS-KO. IVCD понимается в данном документе и в контексте настоящего изобретения как интегрированная плотность жизнеспособных клеток.

Параметр способа	Получение конструкции на основе BiTE®- антитела к CD33 х CD3 в способе FB	Получение конструкции на основе BiTE®- антитела к CD33 х CD3 в способе СМ
Количественные показатели культуры клеток		
<i>2 цикла при 3 л в случае FB; 4 цикла при 3 л в случае СМ. Представлены как абсолютные числа, так и нормализованные относительно FB (в скобках)</i>		
Продолжительность продукционного культивирования (дни)	15 [1]	42 [2,8]
Конечная IVCD (10 ⁶ клеток-день/мл)	212 [1]	2937 [13,9]
Средняя продуктивность НССФ (г/л объема биореактора)	0,6 [1]	11,9 [21,0]
Средняя суточная продуктивность НССФ (мг/л объема биореактора/день)	42 [1]	284 [6,8]
Показатели качества продукта		
<i>В случае FB анализировали 2 образца элюата из хроматографии с захватом; в случае СМ анализировали 13 образцов элюата из хроматографии с захватом (дни 14, 16, 18, 21, 23, 25, 28, 30, 32, 35, 37, 39, 42) для 4 циклов (фигура 11). Представлены как абсолютные числа, так и нормализованное среднее значение относительно среднего по FB (в скобках)</i>		
Содержание НМВ в элюате из хроматографии с захватом (%)	21,1 [1]	8,8 [0,41]
Содержание ЛМВ в элюате из хроматографии с захватом (%)	10,1 [1]	0,3 [0,03]

Пример 6. Сравнение режима традиционного 15-дневного периодического культивирования с подпиткой и гибридного 10-дневного периодического культивирования с подпиткой при получении конструкции на основе BiTE®-антитела к CD33 х CD3

Чтобы получить преимущества, заключающиеся в более низкой концентрации продукта и лучшем качестве продукта, за счет способа СМ, но свести к минимуму

продолжительность культивирования, тестировали гибридный способ периодического культивирования с подпиткой. В этом случае способ представлял собой периодическое культивирование с подпиткой от момента инокуляции до дня 7, за которым следовало перфузионное культивирование небольшой продолжительности с применением системы фильтрации с переменным тангенциальным потоком (ATF) для сбора. Удаление продукта аналогично таковому в способе СМ снижало концентрацию продукта и повышалось качество продукта.

Получение конструкции на основе ViTE®-антитела к CD33 x CD3 в традиционном 15-дневном способе периодического культивирования с подпиткой (традиционный FB)

Способ FB начинали с размораживания флакона, содержащего клетки яичника китайского хомячка (CHO), экспрессирующие конструкцию на основе ViTE® антитела к CD33 x CD3 (клон В). Во время наращивания биомассы клетки ресуспендировали в свежей селективной ростовой среде при целевой плотности жизнеспособных клеток (VCD). Объем культуры последовательно увеличивали во встряхиваемых колбах или биореакторах для создания количества клеточной массы, достаточного для инокуляции, в конечном итоге, в биореактор для получения путем периодического культивирования с подпиткой (масштаб 3 л).

После инокуляции клеток в производственный биореактор при плотности клеток $0,8 \times 10^6$ клеток/мл культуру подпитывали определенным количеством проприетарной среды с химически определенным составом в дни 3, 6 и 8. Культуру поддерживали при pH 6,9, уровне растворенного кислорода 48 мм рт. ст. и 36°C. Плотность клеток (CDV, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс), метаболиты (NovaFlex, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс) и титр (HPLC-анализ) измеряли на протяжении всего времени культивирования. При различной продолжительности продуцирования (10 дней или 15 дней) проводили сбор и осветление с помощью центрифугирования с получением собранной культуральной жидкости (HCCF), которую подвергали дальнейшей хроматографии с захватом с помощью белка-L и элюат анализировали в отношении показателей качества продукта с применением эксклюзионной хроматографии (SE-HPLC) и катионообменной хроматографии (CEX-HPLC).

Получение конструкции на основе ViTE®-антитела к CD33 x CD3 в гибридном 10-дневном способе периодического культивирования с подпиткой (гибридный FB)

В гибридном способе FB применяли те же условия масштабирования, продуцирования и отбора образцов, что и при традиционном FB. В случае гибридного способа FB с 3-дневной микрофильтрацией 1 VVD (гибридный с 3D-1VVD) культуру подпитывали определенным количеством проприетарной питательной среды с химически определенным составом в дни 3 и 6. В день 7 культуру перфузировали с помощью проприетарной перфузионной среды с химически определенным составом при 1 объеме сосуда в день (1 VVD) в течение 3 дней с применением системы переменного фильтрования в тангенциальном потоке (ATF) (Refine Technologies, Ганновер, Нью-Джерси) с фильтрами из полиэфирсульфона с отсечением по 750 кДа (GE Healthcare, Питтсбург, Пенсильвания).

Продукт на основе ViTE-антитела к CD33 x CD3 пропускали через фильтр и собирали в виде HCCF в течение дней 7-10. HCCF подвергали дальнейшей хроматографии с захватом с помощью белка-L и элюат анализировали в отношении показателей качества продукта с применением эксклюзионной хроматографии (SE-HPLC) и катионообменной хроматографии (CEX-HPLC). Нормализованные значения, указанные в таблице 10, соответствуют среднему значению всех абсолютных чисел, разделенному на среднее значение всех абсолютных чисел при FB; в случае FB они соответствуют 1; в случае CM представляют собой одно число, соответствующему описанному соотношению.

Характеристики культуры клеток (**фигура 12, таблица 10**) и уровни показателей качества продукта (**таблица 10**) при получении конструкции на основе ViTE®-антитела к CD33 x CD3 в гибридном способе с 3D-1VVD были улучшены по сравнению с получением конструкции на основе ViTE®-антитела к CD33 x CD3 в традиционном 15-дневном способе FB. Гибридный 10-дневный способ FB с 3D-1VVD продемонстрировал такую же объемную продуктивность, как и традиционный 15-дневный способ FB, однако первый характеризовался более короткой продолжительностью, более высокой суточной объемной продуктивностью и лучшим качеством продукта (**таблица 10**). В частности, при получении конструкции на основе ViTE-антитела к CD33 x CD3 в гибридном 10-дневном способе FB с 3D-1VVD продемонстрированы более низкая концентрация HCCF при меньшей агрегации продукта и меньшая химическая и физическая деградация продукта.

Способы анализа качества продукта

Эксклюзионная хроматография-высокоэффективная жидкостная хроматография (SE-HPLC)

SE-HPLC проводили с применением колонки для эксклюзионной хроматографии Waters BEH200 (4,6×150 мм, 1,7 мкм) и системы Waters UHPLC. Образцы белка вводили в чистом виде и изократически разделяли с применением фосфатного буфера, содержащего соль NaCl (подвижная фаза представляла собой 100 мМ фосфата натрия, 250 мМ NaCl при pH 6,8), при скорости потока 0,4 мл/мин, и элюент отслеживали по поглощению УФ при 280 нм. Загружали приблизительно 6 мкг образца.

Катионообменная высокоэффективная хроматография для анализа заряженных вариантов (CEX-HPLC)

Разделение посредством хроматографии со слабым катионообменником (CEX) проводили с применением колонки Waters Protein-Pak Hi Res CM, 4,6×100 мм, и системы ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии Waters (UHPLC). Перед загрузкой образцы белка предварительно обрабатывали буфером для составления из 10 мМ фосфата калия, 8% сахарозы, 0,01% (вес/объем) полисорбата 80, 1% (вес/объем) каптизола (pH 6,1±0,04). Образцы разделяли при заданной температуре 26°C при скорости потока 0,5 мл/мин в условиях различных градиентов трех подвижных фаз (А, В и С). Подвижная фаза А представляла собой 50 мМ фосфат натрия при pH 6,0, подвижная фаза В представляла собой 50 мМ Tris-HCl, 250 мМ хлорида натрия при pH 8,0, а подвижная фаза С представляла собой 50 мМ Tris-HCl, 500 мМ хлорида натрия при pH 8,0. Вводили приблизительно 8,0 мкг

образца и сигнал отслеживали с помощью FLD-детекции (возбуждение при 280 нм, излучение при 345 нм).

Таблица 10. Сравнение получения конструкции на основе BiTE®-антитела к CD33 х CD3 традиционным 15-дневным способом FB с гибридным 10-дневным способом FB с 3D-1VVD с применением одной и той же линии клеток CHO (клон В), полученной от хозяина с GS-KO. IVCD понимается в данном документе и в контексте настоящего изобретения как интегрированная плотность жизнеспособных клеток.

Параметр способа	Получение конструкции на основе BiTE®-антитела к CD33 x CD3 в традиционном способе FB		Получение конструкции на основе BiTE®-антитела к CD33 x CD3 в гибридном 3D-1VVD 10-дневном способе FB
	10-дневный	15-дневный	
Количественные показатели культуры клеток			
3 цикла при 3 л в случае 10-дневного традиционного FB; 2 цикла в случае 15-дневного традиционного FB; 3 цикла при 3 л в случае гибридного способа с 3D-1VVD. Представлены как абсолютные числа, так и нормализованные относительно 15-дневного традиционного FB (в скобках)			
Продолжительность продукционного культивирования (дни)	10 [0,67]	15 [1]	10 [0,67]
Конечная IVCD (10 ⁶ клеток-день/мл)	140,4 [0,66]	211,6 [1]	212,9 [1,01]
Средняя концентрация НССФ (г/л)	0,43 [0,52]	0,84 [1]	0,18 [0,21]
Средняя продуктивность НССФ (г/л объема биореактора)	0,42 [0,67]	0,62 [1]	0,61 [1]
Средняя суточная продуктивность НССФ (мг/л/день)	42 [1]	42 [1]	61 [1,45]
Показатели качества продукта			
В случае 10-дневного традиционного FB анализировали 3 образца элюата из			

хроматографии с захватом; в случае 15-дневного традиционного FB анализировали 2 образца элюата из хроматографии с захватом; в случае гибридного способа 3D-IVVD анализировали 3 образца элюата из хроматографии с захватом. Представлены как абсолютные числа, так и нормализованное среднее значение относительно среднего значения для 15-дневного традиционного FB (в скобках)

Содержание SEC- HMW в элюате из хроматографии с захватом (%)	9,3 [0,44]	21,1 [1]	5,4 [0,25]
Содержание SEC- LMW в элюате из хроматографии с захватом (%)	0 [0]	10,1 [1]	0 [0]
СЕМ-НПЛС кислотные разновидности в элюате из хроматографии с захватом (%)	17,4	Не измеряли	9,0

Пример 7. Сравнение режима периодического культивирования с подпиткой и непрерывного производства при получении ViTE(R)-HLE к ВСМА х CD3

Получение ViTE(R)-HLE к ВСМА X CD3 в способе периодического культивирования с подпиткой (FB)

Способ FB начинали с размораживания флакона, содержащего клетки яичника китайского хомячка (CHO), экспрессирующие ViTE(R)-HLE к ВСМА х CD3. Во время наращивания биомассы клетки ресуспендировали в свежей селективной ростовой среде при целевой плотности жизнеспособных клеток (VCD). Объем культуры последовательно увеличивали во встряхиваемых колбах для создания количества клеточной массы, достаточного для инокуляции, в конечном итоге, в биореактор для получения путем периодического культивирования с подпиткой (масштаб 2 л).

После инокуляции клеток в продукционный биореактор при плотности клеток $1,0 \times 10^6$ клеток/мл культуру подпитывали определенным количеством проприетарной среды с химически определенным составом в дни 3, 6 и 8. Культуру поддерживали при pH 6,9, уровне растворенного кислорода 64 мм рт. ст. и 36°C, с температурным сдвигом до 34°C в приблизительно день 6. Плотность клеток (CDV, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс), метаболиты (NovaFlex, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс) и титр (HPLC-анализ) измеряли на протяжении всего времени культивирования. После 12 дней продуцирования

проводили сбор и осветление посредством центрифугирования и фильтрации с получением собранной культуральной жидкости (HCCF), которую подвергали дальнейшей хроматографии с захватом с помощью белка-А, и элюат анализировали в отношении показателей качества продукта и связанных со способом примесей с применением аналитической катионообменной хроматографии (СЕХ-НPLC), пептидного картирования, капиллярного электрофореза на геле с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях, ELISA для выявления усеченного белка клетки-хозяина (HCP) и анализа ДНК (qPCR).

Получение BITE(R)-HLE к BCMA X CD3 в способе непрерывного производства (CM)

Способ CM начинали с размораживания флакона, содержащего клетки CHO, экспрессирующие BiTE(R)-HLE к BCMA x CD3. Во время наращивания биомассы клетки ресуспендировали в свежей селективной ростовой среде при целевой плотности жизнеспособных клеток (VCD). Объем культуры последовательно увеличивали во встряхиваемых колбах или биореакторах для создания количества клеточной массы, достаточного для инокуляции, в конечном итоге, в производственный биореактор для перфузионного культивирования (масштаб 10 л или 50 л).

После инокуляции клеток в производственный биореактор при $0,7 \times 10^6$ клеток/мл происходила начальная фаза роста клеток в течение 12 дней для увеличения плотности и биомассы клеток до заданного значения, составляющего 70 пФ/см ($40\text{--}60 \times 10^6$ клеток/мл), как измерено с помощью емкостного зонда (Hamilton Bonaduz AG, Швейцария). Производственный биореактор поддерживали при pH 6,9, уровне растворенного кислорода 64 мм рт. ст. и 36°C. Перфузионное культивирование начинали в день 4 фазы роста клеток с применением системы фильтрации с переменным тангенциальным потоком (ATF) (Refine Technologies, Ганновер, Нью-Джерси) с фильтрами из полиэфирсульфона с размером пор 0,2 мкм (GE Healthcare, Питтсбург, Пенсильвания) и проприетарной перфузионной средой с определенным химическим составом при скорости перфузии, составляющей 0,4 объема биореактора в день (VVD). Скорость перфузии увеличивали постепенно, например, от 0,4 VVD в день 4 до 2 VVD в день 12. После достижения заданного значения биомассы в день 12 температуру культуры клеток снижали до 34°C, начинали сбор HCCF (т. е. бесклеточного пермеата, содержащего BITE(R)-HLE к BCMA X CD3) и перфузионное культивирование продолжали в течение 28 дополнительных дней путем подпитки при скорости перфузии 2 VVD (удельная скорость перфузии, CSPR, в стационарной фазе, составляющая 0,03-0,05 нл/клетка-день) и вымывания лишних клеток для поддержания заданного значения биомассы. Плотность клеток (CDV, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс), метаболиты (NovaFlex, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс) и титр пермеата (HPLC-анализ) измеряли на протяжении всего времени культивирования. HCCF собирали при комнатной температуре с интервалами в 24 часа и подвергали дальнейшей хроматографии с захватом с помощью белка-А. Элюат из белка-А в дни 19 и 40 (день 7 и день 28 стационарной фазы) анализировали в отношении показателей качества продукта и

связанных со способом примесей с применением аналитической катионообменной хроматографии (CEX-HPLC), пептидного картирования, капиллярного электрофореза на геле с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях, ELISA для выявления усеченного белка клетки-хозяина (HCP) и анализа ДНК (qPCR).

Характеристики культуры клеток (**фигура 13, таблица 11**), показатели качества продукта и уровни связанных со способом примесей (**таблица 11**) при получении BITE(R)-HLE к BCMA X CD3 в способе CM были улучшены по сравнению с получением BITE(R)-HLE к BCMA X CD3 в способе FB. Более высокая объемная продуктивность, меньшая химическая и физическая деградация продукта и меньшее количество связанных со способом примесей были продемонстрированы при получении BITE(R)-HLE к BCMA X CD3 в способе CM на этапе накопления. Нормализованные значения, указанные в таблице 11, соответствуют среднему значению всех абсолютных чисел, разделенному на среднее значение всех абсолютных чисел при FB; в случае FB они соответствуют 1; в случае CM представляют собой одно число, соответствующему описанному соотношению.

Способы анализа качества продукта

Катионообменная высокоэффективная хроматография для анализа заряженных вариантов (CEX-HPLC)

Разделение посредством хроматографии со слабым катионообменником (CEX) проводили с помощью колонки Thermo Scientific™ ProPac WCX-10 (4,0 × 250 мм, 10 мкм) и Agilent HPLC серии 1100. Образцы белка разбавляли до 500 мкг/мл с помощью подвижной фазы А и разделяли при установленной температуре 30°C с применением возрастающего градиента NaCl. Подвижная фаза А представляла собой 50 мМ фосфата натрия при pH 6,0, подвижная фаза В представляла собой 50 мМ фосфата натрия, 500 мМ NaCl при pH 6,0. Линейный градиент выполнялся от 10% В до 40% В за 50 мин при скорости потока 0,5 мл/мин. Вводили приблизительно 50 мкг образца и сигнал отслеживали с помощью УФ-детекции при 220 нм посредством детектора с переменной длиной волны.

Триптиновое/эластазное пептидное картирование в отношении химических модификаций

Образцы белка расщепляли посредством способа на основе фильтра с применением устройства Millipore Microcon 30K. Образец белка вносили на фильтр, центрифугировали для удаления матрикса из образца, затем денатурировали в буфере на основе 6 М гидрохлорида гуанидина (GuHCl) (Thermo Fisher Scientific, Рокфорд, Иллинойс), содержащем метионин, восстанавливали с помощью 37,5 мМ дитиотреитола (DTT) (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури), при 37°C в течение 30 мин и затем подвергали алкилированию посредством инкубации с 87,5 мМ иодуксусной кислотой (IAA) (например, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури) в течение 20 мин в темноте при комнатной температуре. Непрореагировавшую IAA гасили с помощью добавления DTT. Все вышеперечисленные стадии происходили на фильтре. Затем в образцах проводили замену буфера на буфер для расщепления (50 мМ Tris, pH 7,8, содержащий метионин) с помощью центрифугирования для удаления любых остаточных количеств DTT и IAA. Расщепление

трипсином проводили на фильтре в течение 1 ч при 37°C с применением отношения фермента к белку 1:20 (вес/вес). Небольшие продукты триптического расщепления собирали с помощью центрифугирования, а крупные продукты триптического расщепления подвергали расщеплению эластазой, проводимому на фильтре в течение 30 мин при 37°C с применением отношения фермента к белку 1:20 (вес/вес). Смесь, полученную в результате расщепления, собирали с помощью центрифугирования и затем гасили путем добавления 8 M GuHCl в 250 mM ацетатном буфере при pH 4,7.

Анализ на основе жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LC-MS) проводили с применением системы высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) Agilent 1260 Infinity II непосредственно сопряженной с масс-спектрометром Thermo Scientific Q-Exactive.

Продукты расщепления белков разделяли с помощью обращенной фазы с применением колонки Water Acquity UPLC пептид-BEH C18 (2,1 × 150 мм, 1,7 мкм), при этом температуру колонки поддерживали при 50°C. Подвижная фаза А состояла из 0,10% (объем/объем) муравьиной кислоты (FA) в воде, и подвижная фаза В представляла собой 0,1% (объем/объем) FA в ацетонитриле (ACN). В колонку вводили приблизительно 6,25 мкг расщепленного белка. Для разделения пептидов применяли градиент (от 1 до 36% фазы В за 78 мин) при скорости потока, составляющей 0,25 мл/мин. Элюируемые пептиды отслеживали с помощью MS.

Для идентификации пептидов и анализа их модификаций использовали эксперимент с зависимой от данных тандемной MS (MS/MS). Получали полную сканограмму от 200 до 2000 масса/заряд в режиме положительных ионов, за которой следует 5 сканограмм при зависимой от данных MS/MS для идентификации последовательности пептида. Количественная оценка была основана на данных масс-спектрометрии выбранного отслеживания ионов с применением приведенного ниже уравнения:

Уравнение 1.

$$\% \text{ модификации} = \frac{A_{\text{модифиц}}}{A_{\text{модифиц}} + A_{\text{немодифиц}}} \times 100$$

где % модификации представляет собой уровень модифицированных пептидов, $A_{\text{модифиц}}$ представляет собой область хроматограммы по выделенному иону для модифицированного пептида, $A_{\text{немодифиц}}$ представляет собой область хроматограммы по выделенному иону для немодифицированного пептида.

Капиллярный электрофорез на геле с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях (RCE-SDS)

CE-SDS в восстанавливающих условиях проводили с помощью системы Beckman Coulter ProteomeLab PA800 PLUS CE. Образцы белка разбавляли водой до 0,5 мг/мл и затем восстанавливали с помощью β-меркаптоэтанола (β-ME) в буфере для образца Beckman SDS при 70°C в течение 10 мин (Beckman Coulter, Брея, Калифорния). Образцы

восстановленного и денатурированного белка вводили электрокинетически (5 кВ в течение 20 с) в капилляр из плавленого кремния без покрытия (ID 50 мкм x эффективная длина 30,0 см), разделяли с применением буфера для геля с SDS (разделение при 15 кВ в течение 40 мин) и проводили детекцию с применением УФ при 220 нм с помощью матричного фотодиодного детектора.

ELISA для выявления белка клетки-хозяина (HCP)

Микротитрационный планшет покрывают иммуноглобулином G кролика (IgG) к HCP (Amgen, полученное в лаборатории антители). После того, как планшет промывают и блокируют, тестовые образцы, контроли и калибровочные стандарты HCP добавляют в планшет и инкубируют. Несвязавшиеся белки вымывают из планшета и в планшет добавляют объединенный IgG кролика к HCP, конъюгированный с биотином (Amgen, полученное в лаборатории антители) и инкубируют. После еще одной промывки в планшет добавляют конъюгат Streptavidin™ с пероксидазой хрена (HRP-конъюгат) (Amersham-GE, Бакингемшир, Великобритания) и инкубируют. Планшет промывают в последний раз и в планшет добавляют хромогенный субстрат тетраметилбензидин (TMB) (Kirkegaard and Perry Laboratories, Гейтерсберг, Мэриленд). Проявление цвета останавливают с помощью 1 М фосфорной кислоты, и оптическую плотность измеряют с помощью спектрофотометра.

Способ анализа ДНК (qPCR)

Образцы готовили путем расщепления протеиназой К с последующей экстракцией ДНК и осаждением изопропиловым спиртом. Праймеры разрабатывали для амплификации специфической для клетки СНО повторяющейся последовательности ДНК (называемой Rep A) и специальный зонд разрабатывали для отжига между ними. Зонд был помечен флуоресцентным репортерным красителем FAM (6-карбоксифлуоресцеином) на его 5'-конце и гасителем флуоресценции TAMRA (6-карбокситетраметилродамином) на его 3'-конце. Когда отоженный зонд является интактным, флуоресценция репортерного красителя гасится из-за близости гасителя флуоресценции. Во время фазы элонгации каждого цикла ПЦР ДНК-полимераза Taq расщепляет отоженный зонд, высвобождая репортерный краситель из зонда, что приводит к увеличению флуоресценции. Такое увеличение флуоресценции прямо пропорционально количеству амплифицированной ДНК-мишени, присутствующей в реакционной смеси, и постоянно отслеживается на всем протяжении реакции ПЦР с помощью инструмента для ПЦР в режиме реального времени. В пределах экспоненциальной фазы амплификации количество последовательности продукта пропорционально исходному количеству ДНК. Стандартную кривую, построенную на основе известных количеств геномной ДНК, выделенной из клеток СНО, применяют для определения соответствия между уровнем флуоресценции и концентрациями геномной ДНК в исходном образце.

Таблица 11. Сравнение получения ViTE(R)-HLE к BCMA x CD3 способом CM со способом FB с применением одной и той же линии клеток СНО, полученной от хозяина с дефицитом DHFR

Параметр способа	Получение ViTE(R)-	Получение
------------------	--------------------	-----------

		HLE к BCMA X CD3 в способе FB	BITE(R)-HLE к BCMA X CD3 в способе CM
Количественные показатели культуры клеток			
<i>3 цикла при 2 л в случае FB; 2 цикла при 10 л и 1 цикл при 50 л в случае CM. Представлены как абсолютные числа, так и нормализованные относительно FB (в скобках)</i>			
Продолжительность культивирования (дни)	продукционного	12 [1]	40 [3,39]
Конечная IVCD (10 ⁶ клеток-день/мл)		85 [1]	1673 [19,66]
Средняя продуктивность объема биореактора)	НССФ (г/л	0,92 [1]	12,19 [13,24]
Средняя суточная продуктивность (мг/л объема биореактора/день)	НССФ	78,0 [1]	304,8 [3,91]
Показатели качества продукта			
<i>В случае FB (2 л) анализировали 3 элюата из хроматографии с захватом; в случае CM (50 л) анализировали 2 элюата из хроматографии с захватом (дни 19 и 40). Представлены как абсолютные числа, так и среднее значение, нормализованное относительно среднего значения для FB (в скобках)</i>			
Пики определенных с помощью СЕХ-HPLC в элюате из хроматографии с захватом (%)	кислотных разновидностей,	7,6; 7,3; 8,7 [1]	3,7; 4,3 [0,51]
Содержание белков (%), усеченных под действием rCE, в элюате из хроматографии с захватом		6,0; 5,5; 5,5 [1]	1,9; 2,0 [0,34]
Деаμιдирование Asn352 в CDR, определенное с помощью пептидного картирования в элюате из хроматографии с захватом (%)		2,2; 2,0; 2,1 [1]	0,4; 0,6 [0,25]
Деаμιдирование Asn355 в CDR, определенное с помощью пептидного картирования в элюате из хроматографии с захватом (%)		6,2; 5,8; 6,1 [1]	1,2; 1,6 [0,23]

Связанные со способом примеси

В случае FB (2 л) анализировали 3 элюата из хроматографии с захватом; в случае CM

(50 л) анализировали 2 элюата из хроматографии с захватом (дни 19 и 40). Представлены как абсолютные числа, так и среднее значение, нормализованное относительно среднего значения для FB (в скобках)

Анализ ДНК с помощью qPCR в элюате из хроматографии с захватом (пг/мг)	1260,2; 1101,3; 1010,0 [1]	<12,4; <16,1 [<0,01]
Белок клетки-хозяина в элюате из хроматографии с захватом (ppm)	957; 1231; 452 [1]	418; 144 [0,32]

Пример 8. Сравнение режима периодического культивирования с подпиткой и непрерывного производства при получении ViTE(R)-HLE к DLL3 x CD3

Получение ViTE(R)-HLE к DLL3 X CD3 в способе периодического культивирования с подпиткой (FB)

Способ FB начинали с размораживания флакона, содержащего клетки CHO, экспрессирующие ViTE(R)-HLE к DLL3 x CD3. Во время наращивания биомассы клетки ресуспендировали в свежей селективной ростовой среде при целевой плотности жизнеспособных клеток (VCD). Объем культуры последовательно увеличивали во встряхиваемых колбах или биореакторах для создания количества клеточной массы, достаточного для инокуляции, в конечном итоге, в биореактор для получения путем периодического культивирования с подпиткой (масштаб 2 л).

После инокуляции клеток в производственный биореактор при плотности клеток $1,0 \times 10^6$ клеток/мл культуру подпитывали определенным количеством проприетарной среды с химически определенным составом в дни 3, 6 и 8. Культуру поддерживали при pH 6,9, постоянном уровне растворенного кислорода 64 мм рт. ст. и 36°C. Плотность клеток (CDV, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс), метаболиты (NovaFlex, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс) и титр (HPLC-анализ) измеряли на протяжении всего времени культивирования. После 12 дней продуцирования супернатант культуры клеток очищали с помощью хроматографии с белком-A и элюат анализировали в отношении показателей качества продукта с применением эксклюзионной хроматографии (SE-HPLC).

Получение ViTE(R)-HLE к DLL3 X CD3 в способе непрерывного производства (CM)

Способ CM начинали с размораживания флакона, содержащего клетки CHO, экспрессирующие ViTE(R)-HLE к DLL3 x CD3. Во время наращивания биомассы клетки ресуспендировали в свежей селективной ростовой среде при целевой плотности жизнеспособных клеток (VCD). Объем культуры последовательно увеличивали во встряхиваемых колбах или биореакторах для создания количества клеточной массы, достаточного для инокуляции, в итоге, в производственный биореактор для перфузионного культивирования (масштаб 2 л).

После инокуляции клеток в производственный биореактор при $1,5 \times 10^6$ клеток/мл происходила начальная фаза роста клеток в течение 10 дней для увеличения плотности и биомассы клеток до заданного значения, составляющего 70 пФ/см ($40\text{--}60 \times 10^6$ клеток/мл),

как измерено с помощью емкостного зонда (Hamilton Bonaduz AG, Швейцария). Продукционный биореактор поддерживали при pH 6,9, уровне растворенного кислорода 64 мм рт. ст. и 36°C. Перфузионное культивирование начинали приблизительно в день 3 фазы роста клеток с использованием системы фильтрации с переменным тангенциальным потоком (ATF) (Refine Technologies, Ганновер, Нью-Джерси) с фильтрами из полиэфирсульфона с размером пор 0,2 мкм (GE Healthcare, Питтсбург, Пенсильвания) и проприетарной перфузионной средой с определенным химическим составом при скорости перфузии, составляющей 0,5 VVD. Скорость перфузии увеличивали постепенно, например, от 0,5 VVD в день 3 до 2 VVD в день 10. После достижения заданного значения биомассы в приблизительно день 10 начинали сбор HCCF (т. е. бесклеточного пермеата, содержащего BiTE(R)-HLE к DLL3 x CD3) и перфузионное культивирование продолжали в течение 13 дополнительных дней путем подпитки при скорости перфузии 2 VVD (CSPR в состоянии равновесия, составляющая 0,03-0,05 нл/клетка-день) и вымывания лишних клеток для поддержания заданного значения биомассы. Плотность клеток (CDV, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс), метаболиты (NovaFlex, Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс) и титр пермеата (HPLC-анализ) измеряли на протяжении всего времени культивирования. Образцы пермеата, отобранные от дня 10 до дня 23, очищали с помощью хроматографии с белком-A и элюат анализировали в отношении показателей качества продукта с применением эксклюзионной хроматографии (SE-HPLC).

Характеристики культуры клеток (**фигура 14, таблица 12**) и показатели качества продукта (**таблица 12**) при получении BiTE(R)-HLE к DLL3 X CD3 в способе CM были улучшены по сравнению с получением BiTE(R)-HLE к DLL3 X CD3 в способе FB с применением одной и той же линии клеток CHO. Нормализованные значения, представленные в **таблице 12**, соответствуют среднему значению всех абсолютных чисел, разделенному на среднее значение всех абсолютных чисел при FB; в случае FB они соответствуют 1; в случае CM представляют собой одно число, соответствующему описанному соотношению. Более высокая объемная продуктивность при меньшей физической деградации продукта были продемонстрированы при получении BiTE(R)-HLE к DLL3 X CD3 в способе CM на этапе накопления. При получении BiTE(R)-HLE к DLL3 X CD3 CM и других BiTE® в способах CM способ сбора путем фильтрации ATF per se является преимущественным при получении пермеата HCCF, который характеризуется как более низкой концентрацией, так и более низким содержанием HMW-разновидностей по сравнению с культуральной жидкостью клеток, сохраняемой в биореакторе (**фигура 15**).

Способы анализа качества продукта

Эксклюзионная хроматография-высокоэффективная жидкостная хроматография (SE-HPLC)

SE-HPLC проводили с применением колонки для эксклюзионной хроматографии Waters BEH200 (4,6×150 мм, 1,7 мкм) и системы Waters UHPLC. Образцы белка вводили в чистом виде и изократически разделяли с применением фосфатного буфера, содержащего соль NaCl (подвижная фаза представляла собой 100 mM фосфата натрия, 250 mM NaCl при

pH 6,8), при скорости потока 0,4 мл/мин, и элюент отслеживали по поглощению УФ при 220 нм. Загружали приблизительно 10 мкг образца.

Капиллярный электрофорез на геле с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях (RCE-SDS)

CE-SDS в восстанавливающих условиях проводили с помощью системы Beckman Coulter ProteomeLab PA800 PLUS CE. Образцы разбавляли до 1,0 мг/мл с помощью буфера для составления и затем восстанавливали с помощью β-меркаптоэтанола (β-ME) в буфере для образцов Beckman SDS при 70°C в течение 10 мин (Beckman Coulter, Брея, Калифорния) до конечной концентрации, составляющей 0,48 мг/мл. Образцы восстановленного и денатурированного белка вводили электрокинетически (10 кВ в течение 30 с) в капилляр из плавленого кремния без покрытия (ID 50 мкм x эффективная длина 20,0 см), разделяли с применением буфера для геля с SDS (разделение при 15 кВ в течение 40 мин) и проводили детекцию с применением УФ при 220 нм с помощью матричного фотодиодного детектора.

Таблица 12. Сравнение получения BiTE(R)-HLE к DLL3 x CD3 способом CM со способом FB с применением одной и той же линии клеток CHO, полученной от хозяина с дефицитом DHFR

Параметр способа	Получение BiTE(R)-HLE к DLL3 X CD3 в способе FB	Получение BiTE(R)-HLE к DLL3 X CD3 в способе CM
Количественные показатели культуры клеток		
<i>2 цикла при 2 л в случае FB; 2 цикла при 2 л в случае CM. Представлены как абсолютные числа, так и нормализованные относительно FB (в скобках) Значения для 38-дневного способа рассчитывали на основании динамики в протестированном экспериментальном 23-дневном способе</i>		
Продолжительность продукционного культивирования (дни)	12 [1]	23 [1,9] 38 [3,2]
Конечная IVCD (10 ⁶ клеток-день/мл)	105,56 [1]	939,22 [8,9] 1604,50 [15,2]
Средняя продуктивность НССФ (г/л объема биореактора)	0,63 [1]	2,75 [4,3] 5,50 [8,7]
Средняя суточная продуктивность НССФ (мг/л объема биореактора/день)	52,66 [1]	119,49 [2,3] 144,65 [2,9]

Показатели качества продукта

В случае FB (2 л) анализировали 2 образца элюата из хроматографии с захватом; в случае СМ анализировали 9-13 образцов элюата из хроматографии с захватом (дни 10-23 из 2 циклов). Представлены как абсолютные числа, так и среднее значение, нормализованное относительно среднего значения для FB (в скобках)

Содержание белков (%), усеченных под действием rCE, в элюате из хроматографии с захватом	3,7; 3,7 [1]	2,4; 1,0; 2,7; 1,1; 2,6; 1,3; 2,7; 2,6; 2,4 [0,57]
Содержание HMW (%), определенное с помощью SEC в элюате из хроматографии с захватом	33,4; 32,6 [1]	26,5; 27,5; 26,0; 24,4; 23,1; 20,3; 20,2; 29,5; 24,3; 27,4; 23,7; 25,2; 19,9 [0,74]

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ непрерывного производства на этапе накопления для получения продукта на основе биспецифического антитела, содержащего по меньшей мере первый и второй связывающий домен, где первый связывающий домен связывается с мишенью, отличной от мишени второго связывающего домена, при этом способ включает стадии:

(i) обеспечения жидкой среды для культивирования клеток, содержащей по меньшей мере одну культуру клеток млекопитающих, в перфузионном биореакторе, где культура клеток млекопитающих способна экспрессировать продукт на основе биспецифического антитела, и где клетки характеризуются концентрацией, составляющей по меньшей мере $0,4 \times 10^6$ клеток/мл в момент инокуляции в перфузионный биореактор,

(ii) выращивания культуры клеток млекопитающих путем применения скорости перфузии (D) для замены жидкой среды для культивирования клеток предпочтительно непрерывным образом без удаления клеток из биореактора, где скорость перфузии первоначально соответствует по меньшей мере 0,4 объема сосуда в день (vvd), а затем увеличивается непрерывно, постепенно или пошагово до по меньшей мере 1 vvd, когда достигается заданное значение биомассы, где заданное значение биомассы равно плотности жизнеспособных клеток (VCD), составляющей по меньшей мере 35×10^6 клеток/мл,

(iii) поддержания перфузионной культуры путем применения скорости перфузии (D) для непрерывной или пошаговой замены жидкой среды для культивирования клеток, предпочтительно без удаления клеток из биореактора, когда достигается заданное значение биомассы, где скорость перфузии на стадии (iii) соответствует по меньшей мере 1 vvd, и

(iv) необязательно вымывания лишних клеток из биореактора для поддержания заданного значения биомассы, где

концентрацию продукта на основе биспецифического антитела в биореакторе поддерживают ниже 3,5 г/л путем непрерывного сбора продукта на основе биспецифического антитела из жидкой среды для культивирования клеток на всем протяжении стадий (ii) - (iv).

2. Способ по п. 1, где на стадии (i) клетки характеризуются концентрацией, составляющей по меньшей мере 1×10^6 клеток/мл в момент инокуляции в биореактор.

3. Способ по п. 1, где на стадии (ii) заданное значение биомассы равно VCD, составляющей по меньшей мере 65×10^6 клеток/мл.

4. Способ по п. 1, где на стадии (ii) заданное значение биомассы равно VCD, составляющей по меньшей мере 71×10^6 клеток/мл.

5. Способ по п. 1, где на стадии (ii) выращивание культуры клеток происходит в течение по меньшей мере 4 дней, предпочтительно в течение по меньшей мере 7 дней, предпочтительно в течение 12 дней.

6. Способ по п. 1, где на стадии (ii) скорость перфузии (D) находится в диапазоне от 0,4 до 7 vvd.

7. Способ по п. 1, где на стадии (iii) скорость перфузии (D) находится в диапазоне от 1 до 7 vvd.

8. Способ по п. 1, где на стадии (iii) скорость перфузии (D) находится в диапазоне от 2 до 6,4 vvd и предпочтительно равна 2 vvd, наиболее предпочтительно 2,01 vvd.

9. Способ по п. 1, где на стадии (iii) скорость перфузии (D) представляет собой удельную скорость перфузии (CSPR) в диапазоне от 0,01 до 0,15 нл/клетка-день (нл на клетку в день), предпочтительно в диапазоне от 0,015 до 0,035 нл/клетка-день или в диапазоне от 0,051 до 0,1 нл/клетка-день.

10. Способ по п. 1, где на стадии (v) концентрация продукта на основе биспецифического антитела поддерживается ниже 1,2 г/л, предпочтительно ниже 0,5 г/л, наиболее предпочтительно ниже 0,12 г/л.

11. Способ по п. 1, где время пребывания продукта на основе биспецифического антитела в биореакторе перед сбором на стадии (v) составляет не более 2 дней, предпочтительно не более 1 дня, наиболее предпочтительно не более 0,5 дня.

12. Способ по п. 1, где процентное содержание мономера в выделенном биспецифическом антителе составляет по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 70% или по меньшей мере 80%, 90%, 93% или 95%.

13. Способ по п. 1, где продукт на основе биспецифического антитела представляет собой полноразмерное биспецифическое антитело или конструкцию на основе неполноразмерного биспецифического антитела.

14. Способ по п. 13, где продукт на основе биспецифического антитела представляет собой полноразмерное биспецифическое антитело, в котором первый и/или второй связывающий домен связывается с мишенью и/или эффекторной клеткой.

15. Способ по п. 13, где конструкция на основе биспецифического антитела содержит увеличивающий период полувыведения фрагмент, предпочтительно увеличивающий период полувыведения фрагмент на основе Fc, полученный из антитела IgG, наиболее предпочтительно увеличивающий период полувыведения фрагмент в виде scFc.

16. Способ по п. 13, где конструкция на основе биспецифического антитела представляет собой биспецифический рекрутер Т-клеток (BiTE[®]).

17. Способ по п. 1, где первый связывающий домен продукта на основе биспецифического антитела связывается с по меньшей мере одним поверхностным антигеном клетки-мишени, выбранным из группы, состоящей из CD19, CD33, EGFRvIII, MSLN, CDH19, FLT3, DLL3, CDH3, BCMA и PSMA.

18. Способ по п. 1, где второй связывающий домен продукта на основе биспецифического антитела связывается с CD3.

19. Способ по п. 1, где первый связывающий домен содержит VH-участок, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-участок, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из группы, состоящей из:

ID NO: 138, CDR-H3, приведенного под SEQ ID NO: 139, CDR-L1, приведенного под SEQ ID NO: 140, CDR-L2, приведенного под SEQ ID NO: 141, и CDR-L3, приведенного под SEQ ID NO: 142,

(l) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 152, CDR-H2, приведенного под SEQ ID NO: 153, CDR-H3, приведенного под SEQ ID NO: 154, CDR-L1, приведенного под SEQ ID NO: 155, CDR-L2, приведенного под SEQ ID NO: 156, и CDR-L3, приведенного под SEQ ID NO: 157, и

(m) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 167, CDR-H2, приведенного под SEQ ID NO: 168, CDR-H3, приведенного под SEQ ID NO: 169, CDR-L1, приведенного под SEQ ID NO: 170, CDR-L2, приведенного под SEQ ID NO: 171, и CDR-L3, приведенного под SEQ ID NO: 172.

20. Способ по п. 1, где собранный продукт на основе биспецифического антитела содержится в собранной культуральной жидкости (HCCF).

21. Способ по п. 1, где HCCF получают на стадиях (ii) и (iii) или только на стадии (iii).

22. Способ по п. 1, где HCCF собирают предпочтительно при комнатной температуре с интервалами 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120 и/или 144 часа или непрерывно и передают на стадии этапа выделения и очистки для дальнейшей обработки, например захвата, продукта на основе биспецифического антитела.

23. Способ по п. 21, где стадии этапа выделения и очистки включают стадии хроматографии с захватом, вирусной инактивации и/или глубокой очистки.

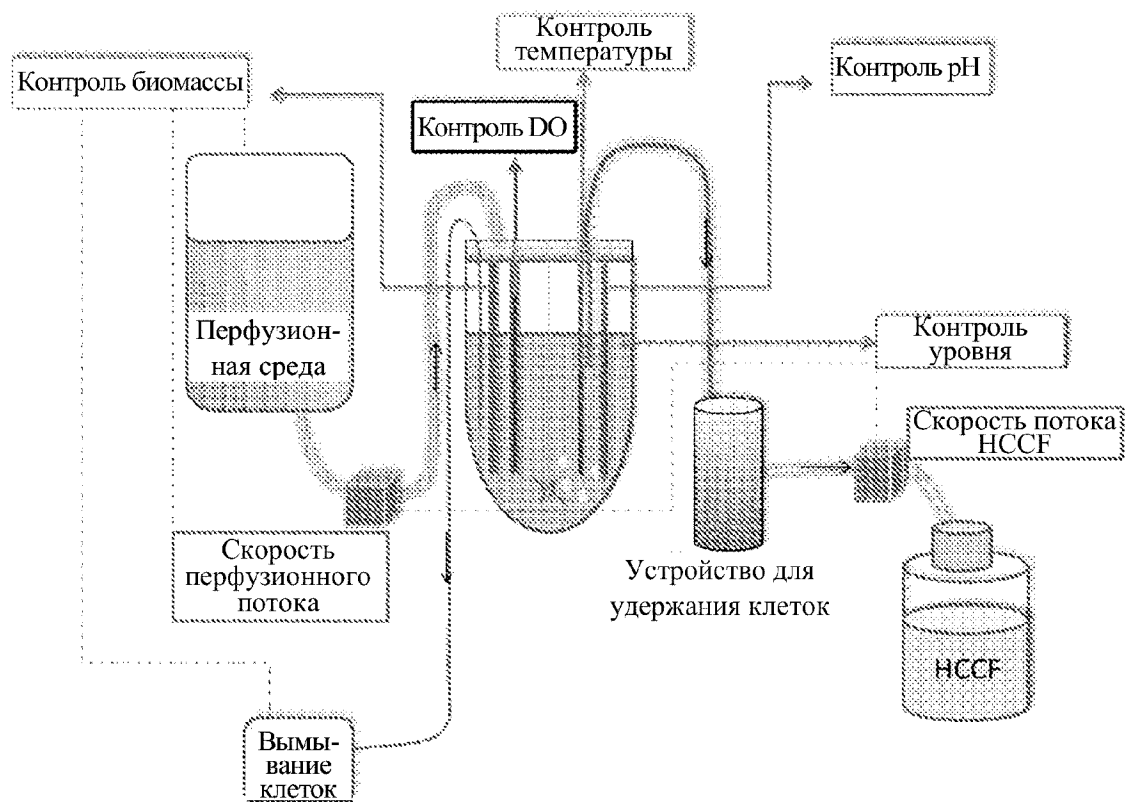
24. Способ по п. 1, где культивирование перфузионной культуры осуществляется непрерывно в течение по меньшей мере 7 дней, предпочтительно в течение по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28 дней, наиболее предпочтительно в течение по меньшей мере 35 дней путем подпитки при определенной удельной скорости перфузии и вымывания лишних клеток из биореактора для поддержания заданного значения биомассы.

25. Аппарат для проведения способа непрерывного производства на этапе накопления по п. 1, содержащий перфузионный биореактор, оснащенный по меньшей мере устройством контроля биомассы, устройством контроля DO и устройством контроля уровня, и входной канал, оснащенный устройством регулирования скорости перфузионного потока, и выпускной канал, оснащенный устройством для удержания клеток и устройством регулирования скорости потока HCCF.

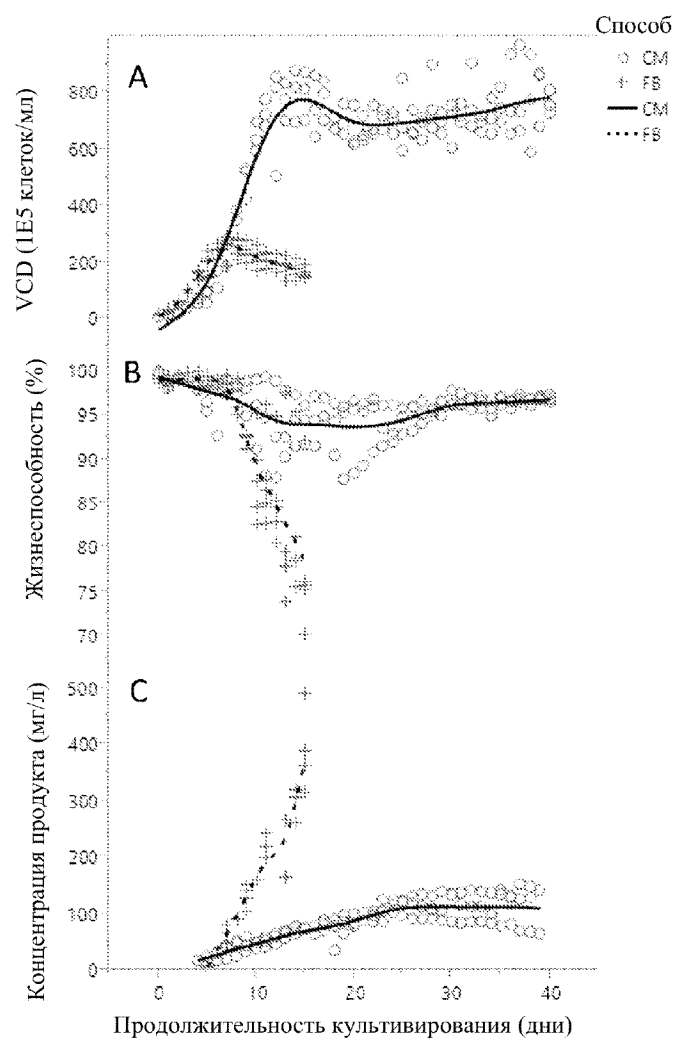
26. Продукт на основе биспецифического антитела, полученный посредством способа непрерывного производства на этапе накопления по п. 1.

По доверенности

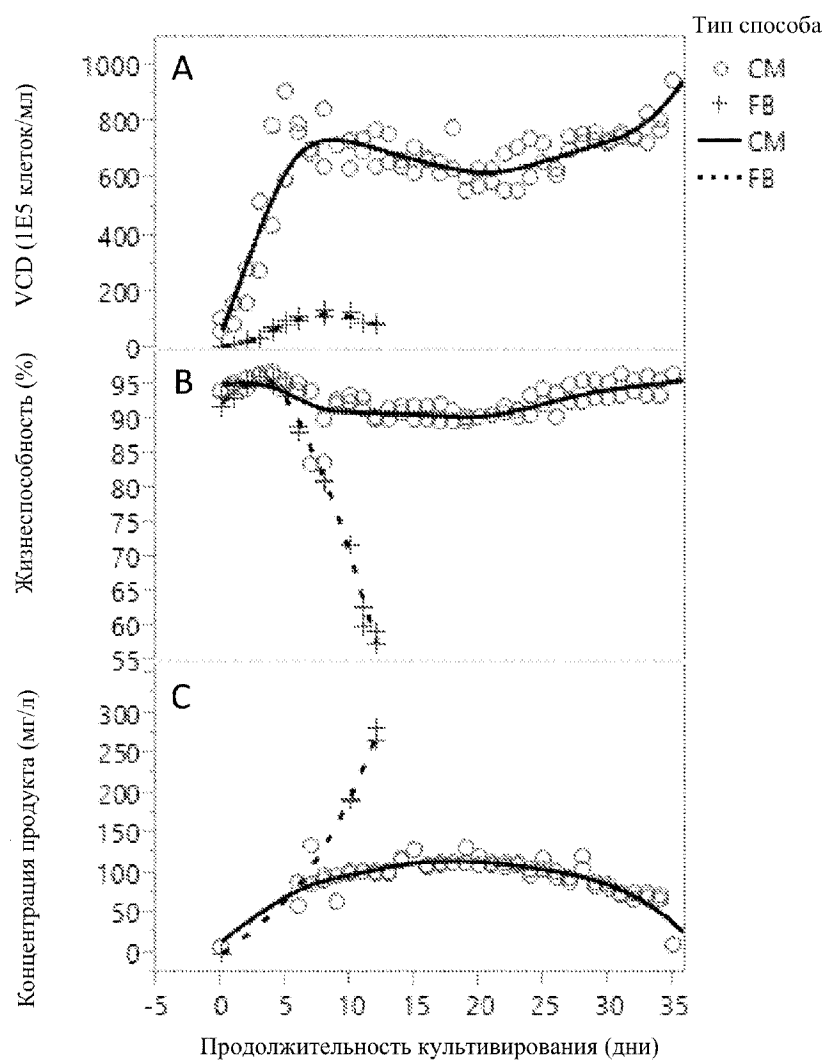
ФИГ. 1



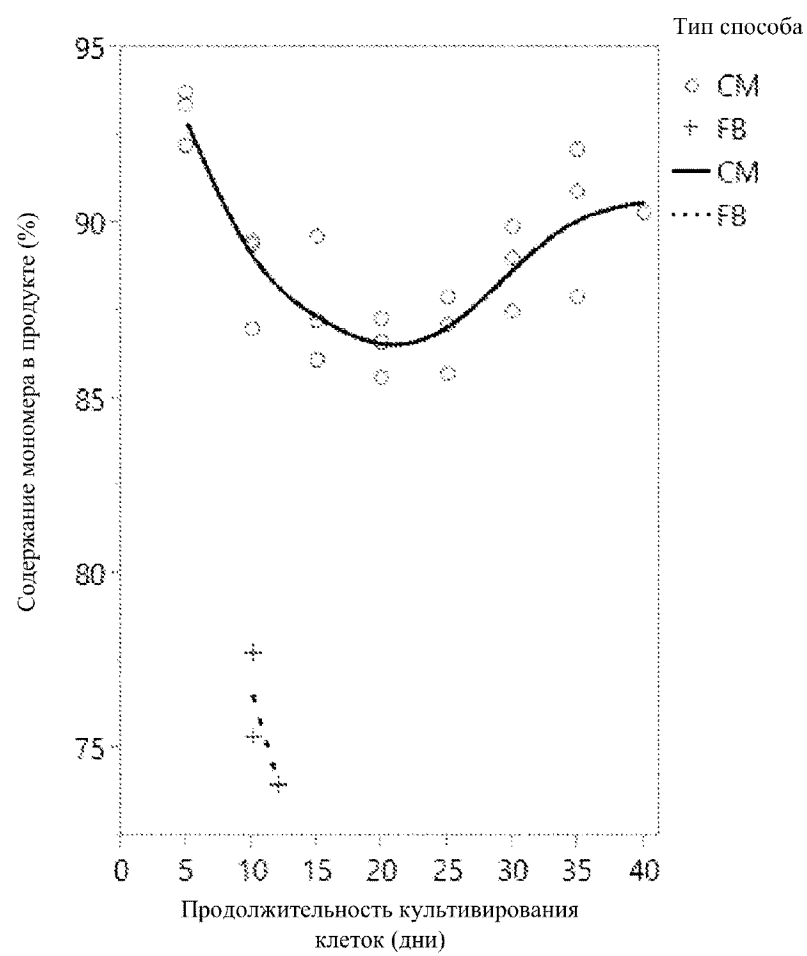
ФИГ. 2



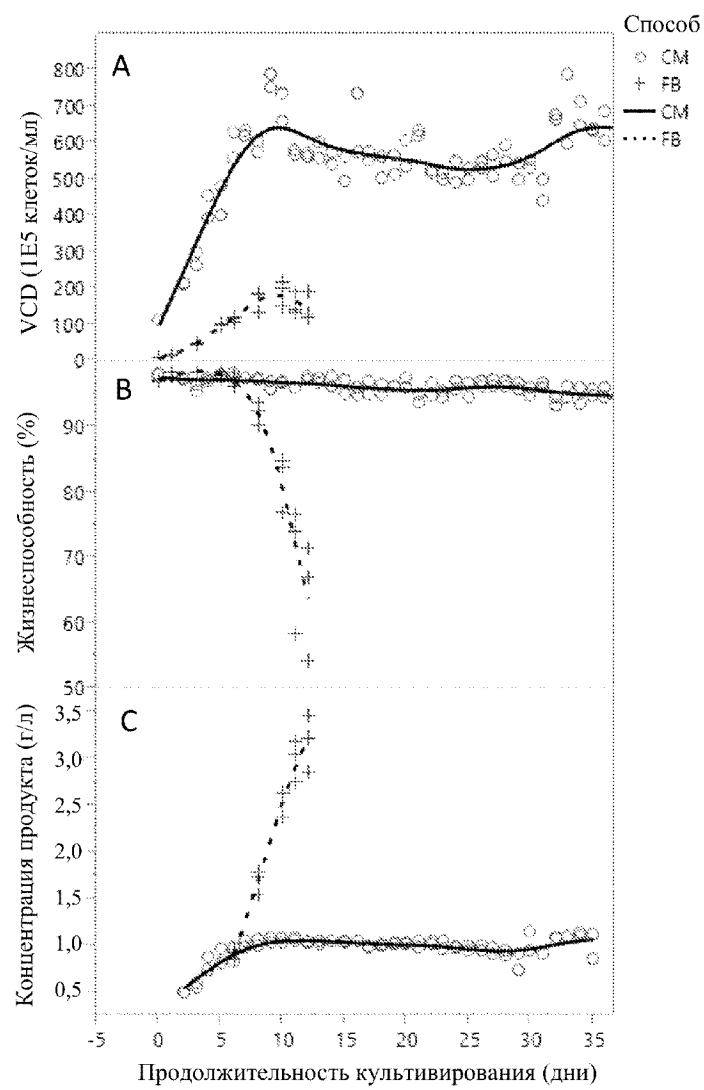
ФИГ. 3



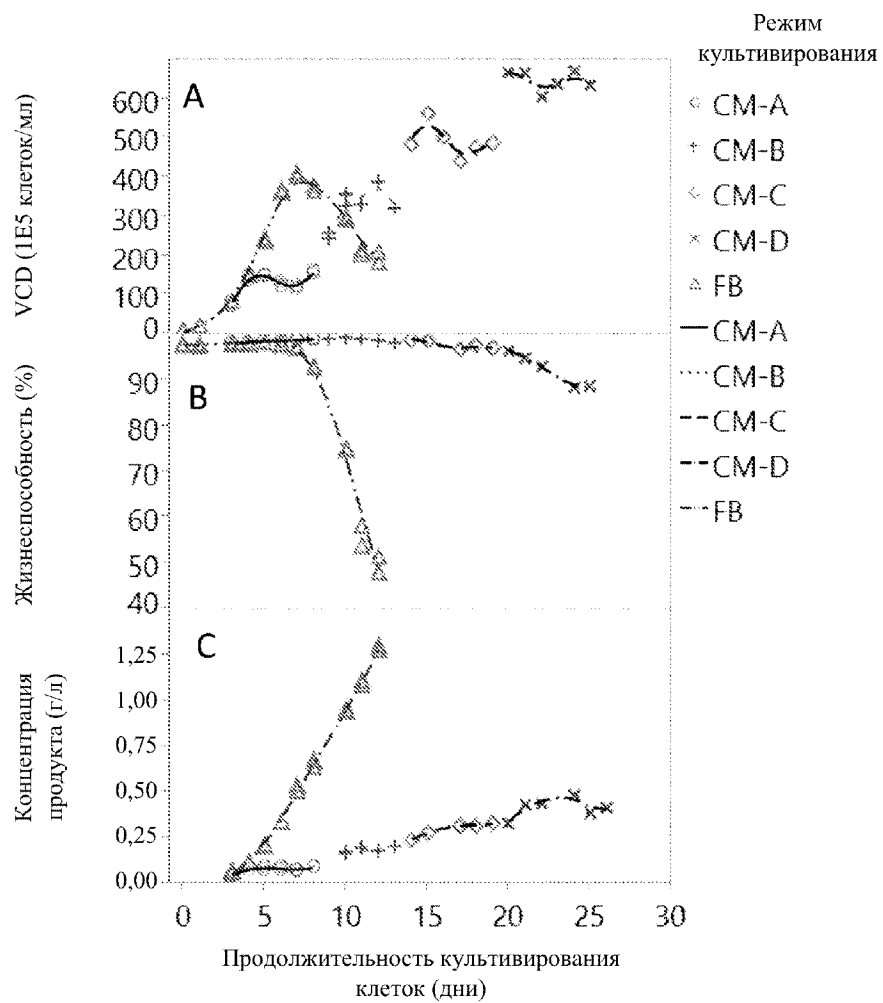
ФИГ. 4



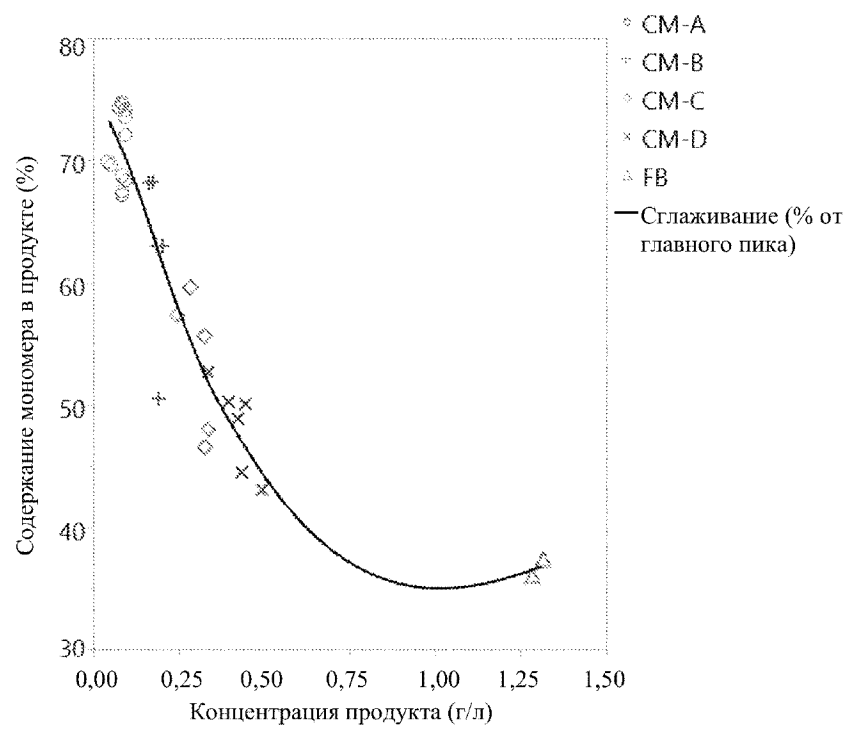
ФИГ. 5



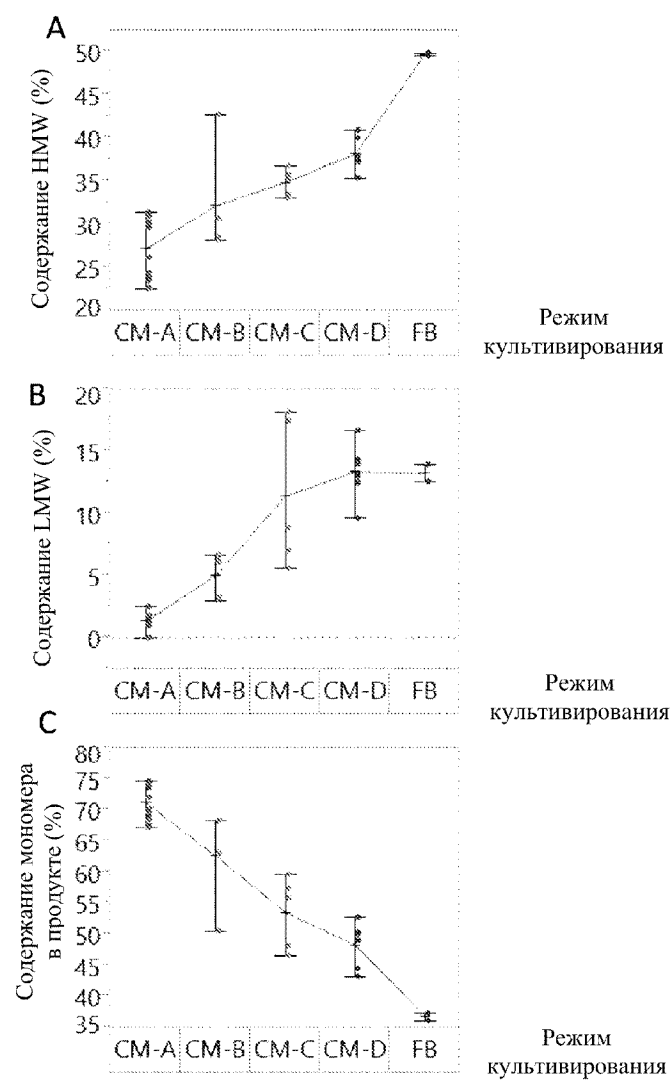
ФИГ. 6



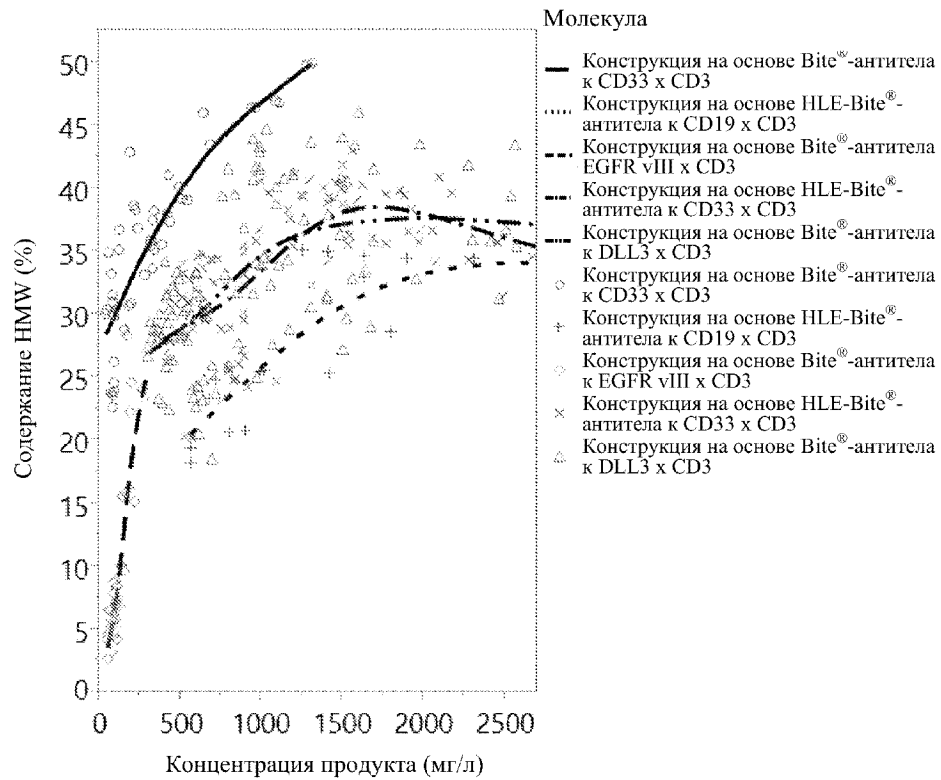
ФИГ. 7



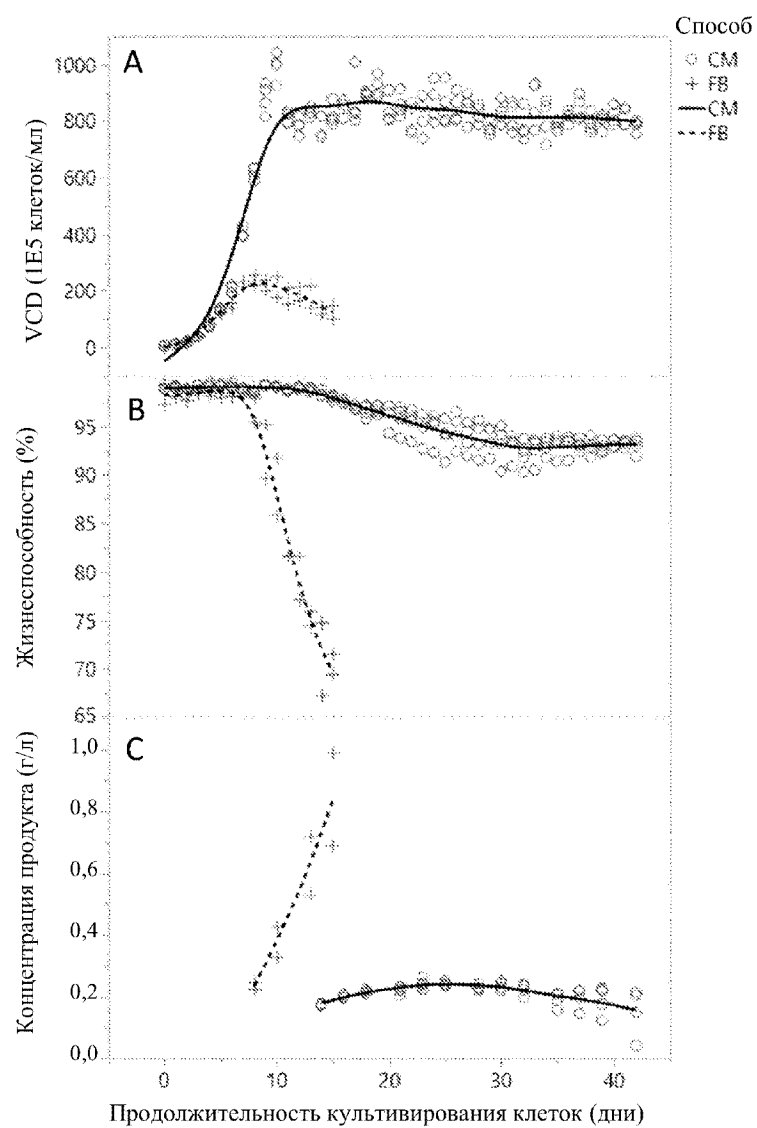
ФИГ. 8



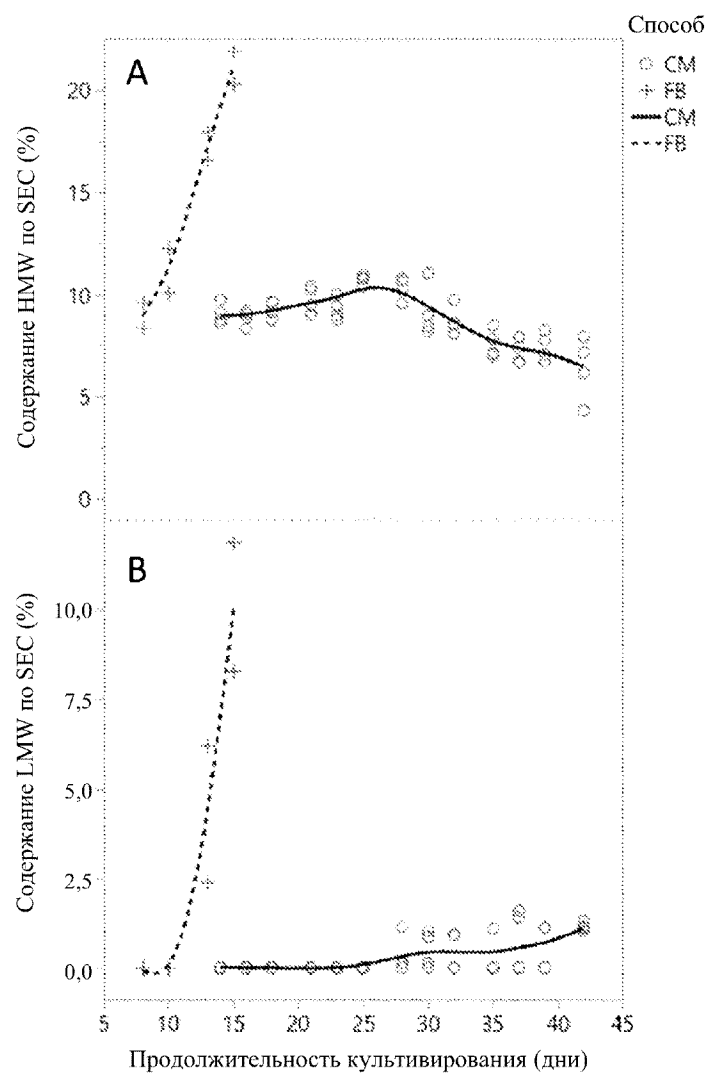
ФИГ. 9



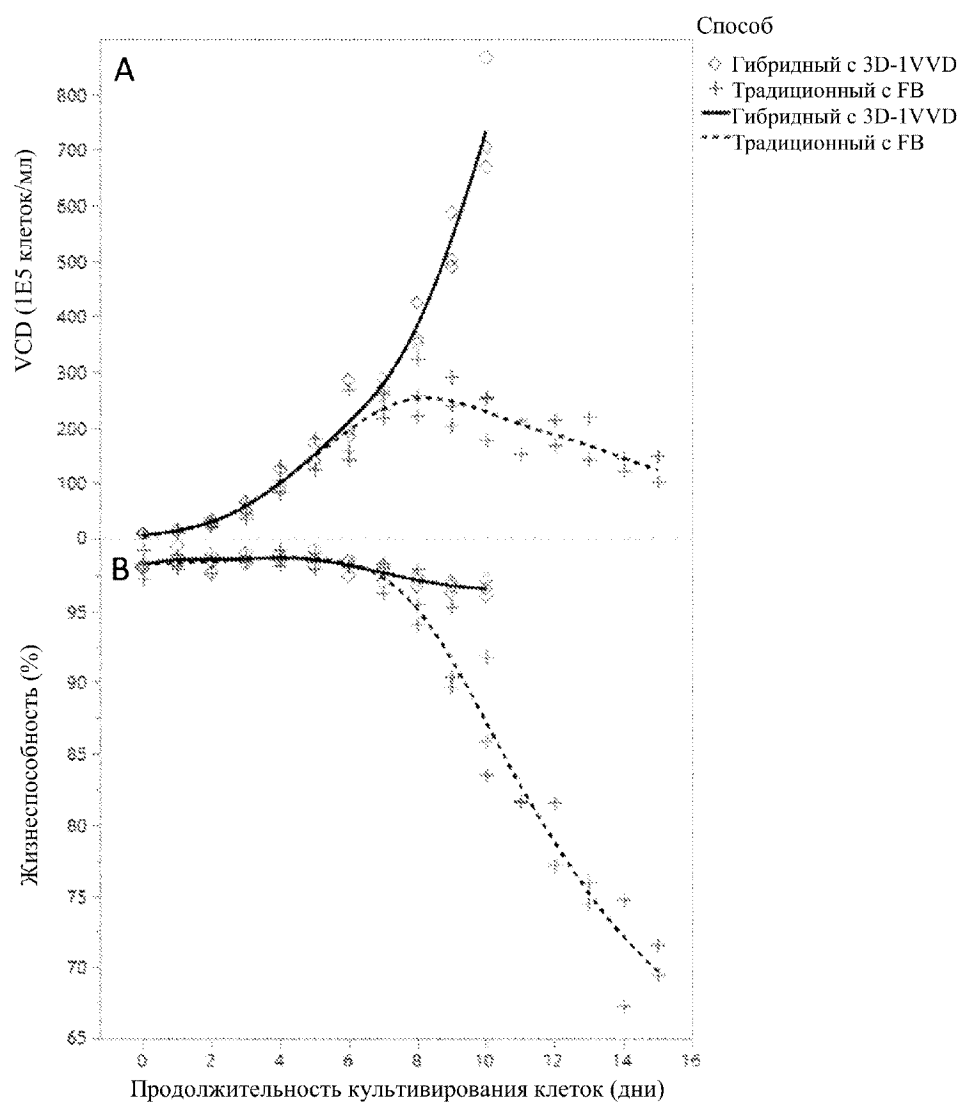
ФИГ. 10



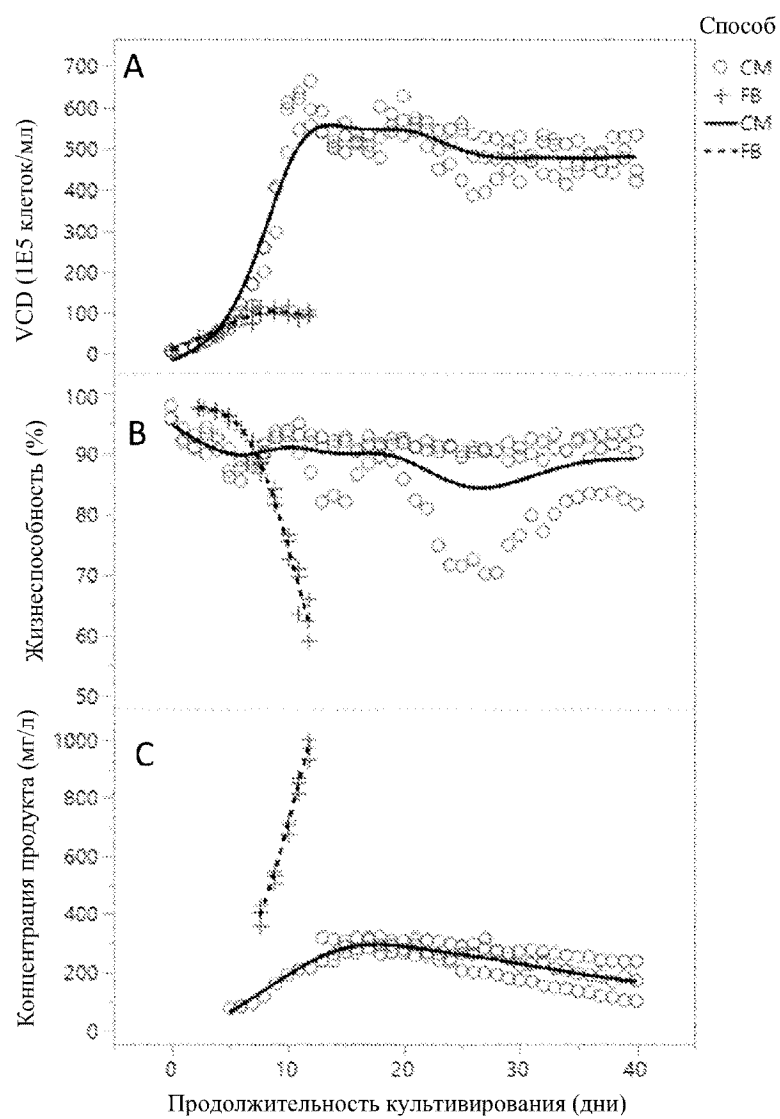
ФИГ. 11



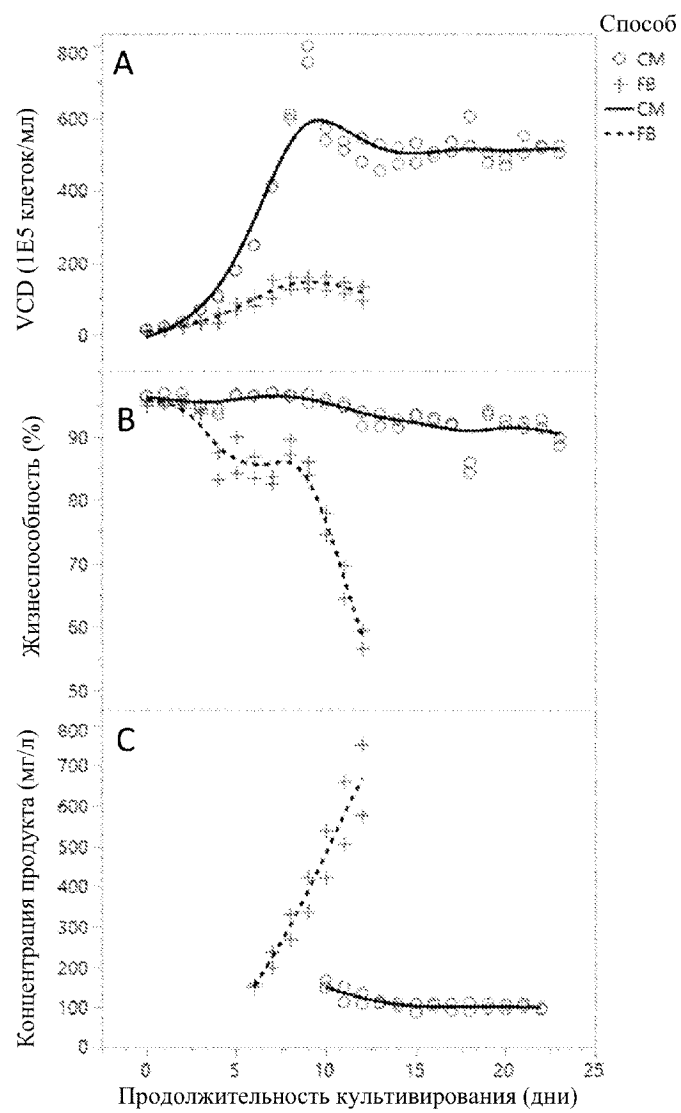
ФИГ. 12



ФИГ. 13



ФИГ. 14



ФИГ. 15

