

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191940** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.12.30

(22) Дата подачи заявки
2020.02.13

(51) Int. Cl. **C07K 16/00** (2006.01)
C07K 16/06 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01)

(54) ПОЛУЧЕНИЕ КОМПОЗИЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ДВА ИЛИ БОЛЕЕ АНТИТЕЛА

(31) 19157286.6; 19178542.7

(32) 2019.02.14; 2019.06.05

(33) EP

(86) PCT/NL2020/050080

(87) WO 2020/167122 2020.08.20

(71) Заявитель:
МЕРУС Н.В. (NL)

(72) Изобретатель:
**Дорнбос Роберт Паул, Баккер
Александр Бертольд Хендрик (NL)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к средствам и способам получения по меньшей мере двух антител. Способы могут включать обеспечение клеток нуклеиновой кислотой, кодирующей антитела; культивирование указанных клеток; сбор антител из культуры и отделение полученных антител от полуантител с помощью ионообменной хроматографии (ИЕХ). В некоторых вариантах осуществления антитела демонстрируют значения времени удерживания при ИЕХ, которые отклоняются на 10% или менее от среднего значений времени удерживания отдельных антител в используемых условиях ИЕХ. Изобретение также относится к композициям получаемых таким образом антител. В некоторых аспектах изобретение относится к композициям, содержащим 2-10 рекомбинантных антител, отличающихся тем, что значения времени удерживания при ИЕХ по меньшей мере двух из указанных антител отличаются на 10% или менее от среднего значений времени удерживания отдельных антител в условиях ИЕХ. Изобретение также относится к композициям, содержащим 2-10 рекомбинантных антител, характеризующихся тем, что pI по меньшей мере двух из указанных антител отличаются на 0,4 единицы или менее от средней pI указанных по меньшей мере двух антител.

A1

202191940

202191940

A1

ПОЛУЧЕНИЕ КОМПОЗИЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ДВА ИЛИ БОЛЕЕ АНТИТЕЛ

Изобретение относится к области антител, в частности к области терапевтических антител. Антитела можно применять при лечении людей. Более конкретно, изобретение
5 относится к получению и/или очистке множества антител. Одна клетка-хозяин может продуцировать множество антител. Антитела могут также продуцироваться смесью клеток-хозяев, каждая из которых продуцирует одно из антител. Изобретение также относится к способам получения композиций, содержащих такие антитела, и очистки таких антител.

10

Поликлональные антитела, как правило, собирают из крови субъекта. Преимущество поликлональных антител заключается в том, что патогены атакуют посредством множества мишеней и эпитопов. Преимуществом моноклональных или
15 рекомбинантных антител являются хорошо изученные специфичность и функция, позволяющие использовать такие антитела в качестве точных лекарственных средств с четко определенным спектром действия и токсичности.

Специфичность моноклонального антитела также может быть и недостатком, в частности, если необходимо воздействовать на множество мишеней. Этот недостаток
20 можно устранять путем добавления в лекарственное средство большего количества антител, но с учетом того, что даже одно терапевтическое антитело может быть дорогостоящим, предполагается, что затраты на такие мультиклональные смеси могут оказаться слишком высокими.

Разработка би-, три- других мультиспецифических антител позволила успешно
25 реализовать некоторые аспекты поликлонального антитела в терапевтических средствах на основе антител. Помимо увеличения числа мишеней она также позволила успешно внедрить дополнительную функциональность, недостижимую ранее с классическими моноспецифическими моно- или поликлональными антителами. Применение множества
30 би-, три- и других мультиспецифических антител в рамках одного и того же типа лечения может обеспечивать дополнительные преимущества.

В настоящем изобретении предложено усовершенствование данной области
35 техники путем описания надежного и экономичного способа очистки терапевтических средств на основе множества антител, полученных из одной клетки-хозяина или в альтернативном варианте осуществления из смеси клеток-хозяев. Изобретение, в

частности, используют для экономичного получения наборов из двух или более антител, предпочтительно мультиспецифических антител.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5

В изобретении предложен способ получения по меньшей мере двух мультиспецифических антител, включающий:

- обеспечение клеток нуклеиновой кислотой, кодирующей мультиспецифические антитела;
- 10 - культивирование указанных клеток;
- сбор мультиспецифических антител из культуры; и
- отделение полученных мультиспецифических антител от полуантител и необязательно моноспецифических антител и/или других нежелательных примесей, связанных с антительным продуктом, с помощью ионообменной
- 15 хроматографии (ИЕХ);

причем способ отличается тем, что мультиспецифические антитела демонстрируют значения времени удерживания при ИЕХ, которые отклоняются на 10% или менее от среднего значений времени удерживания отдельных мультиспецифических антител в используемых условиях ИЕХ. Значения времени удерживания соответствующих

- 20 полуантител и необязательно моноспецифических антител и/или других нежелательных примесей, связанных с антительным продуктом, предпочтительно выходят за пределы диапазона, охватываемого значениями времени удерживания мультиспецифических антител.

- 25 В изобретении также предложен способ получения по меньшей мере двух мультиспецифических антител, включающий

- обеспечение клетки нуклеиновой кислотой, кодирующей мультиспецифические антитела;
- культивирование указанной клетки;
- 30 - сбор мультиспецифических антител из культуры; и
- отделение полученных мультиспецифических антител от полуантител и необязательно моноспецифических антител и/или других нежелательных примесей, связанных с антительным продуктом, с помощью ионообменной хроматографии (ИЕХ);

- 35 причем способ отличается тем, что мультиспецифические антитела демонстрируют по существу одинаковые значения времени удерживания при ИЕХ в используемых условиях

ИЕХ. Значения времени удерживания соответствующих полуантител и необязательно моноспецифических антител и/или других нежелательных примесей, связанных с антительным продуктом, предпочтительно выходят за пределы диапазона, охватываемого значениями времени удерживания антител.

5

В изобретении дополнительно предложен способ получения по меньшей мере двух антител, причем антитела представляют собой моноспецифическое и/или мультиспецифическое антитело, включающий

- обеспечение клеток нуклеиновой кислотой, кодирующей антитела;
- 10 - культивирование указанных клеток;
- сбор антител из культуры; и
- отделение полученных антител от полуантител с помощью ионообменной хроматографии (ИЕХ);

причем способ отличается тем, что антитела демонстрируют по существу одинаковые значения времени удерживания при ИЕХ в используемых условиях ИЕХ. Значения времени удерживания соответствующих полуантител и необязательно моноспецифических антител предпочтительно выходят за пределы диапазона, охватываемого значениями времени удерживания антител.

20 В изобретении также предложена композиция, содержащая 2–10 рекомбинантных антител, получаемых способом, описанным в настоящем документе.

Кроме того, обеспечена композиция, содержащая 2–10 рекомбинантных антител, таких как мультиспецифические антитела, отличающаяся тем, что значения времени удерживания при ИЕХ по меньшей мере двух из указанных антител отличаются на 10% или менее от среднего значений времени удерживания отдельных антител в используемых условиях ИЕХ.

30 Дополнительно обеспечена композиция, содержащая 2–10 рекомбинантных антител, отличающаяся тем, что значения времени удерживания при ИЕХ по меньшей мере двух из указанных антител являются по существу одинаковыми.

Кроме того, обеспечена композиция, содержащая 2–10 рекомбинантных антител, отличающаяся тем, что изоэлектрическая точка (pI) по меньшей мере двух из указанных антител предпочтительно отличается на 0,4 единицы, 0,3, 0,2 и предпочтительно 0,1 единицы или менее от средней pI указанных по меньшей мере двух антител. Значение pI

35

каждого из указанных по меньшей мере двух антител предпочтительно отличается друг от друга на 0,25 единицы или менее.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5

В настоящем документе термин «антитело» означает белковую молекулу, относящуюся к классу белков иммуноглобулинов, содержащую один или более доменов, которые связываются с эпитопом на антигене, причем такие домены получены из вариабельной области антитела или имеют общую с ним гомологию последовательности.

10 Как правило, антитела состоят из базовых структурных единиц, каждая из которых имеет две тяжелые цепи и две легкие цепи. Антитела для терапевтического применения предпочтительно имеют максимально возможное сходство с естественными антителами подлежащего лечению субъекта (например, с человеческими антителами, если субъекты являются людьми). В настоящий документ также включены антитела с удлинённой

15 вариабельной областью тяжелой и/или легкой цепи. Антитело в соответствии с настоящим изобретением не ограничено каким-либо конкретным форматом или способом получения.

Полуантитела представляют собой комбинации тяжелой и легкой цепей, которые

20 не связаны с другой комбинацией тяжелой и легкой цепей и которые не образуют поверхность контакта с другой вариабельной областью или полипептидом, подобным вариабельной области. Другие нежелательные примеси, связанные с антительным продуктом, могут представлять собой свободные легкие цепи, которые не связаны с тяжелой цепью, свободные тяжелые цепи, которые не связаны с легкой цепью или другой

25 тяжелой цепью, или не полностью собранные антитела, не содержащие легкой цепи.

Подходящие клетки для продукции антител известны в данной области и включают клетку гибридомы, клетку яичника китайского хомячка (CHO), клетку NS0 или клетку PER-C6 или множество других клеточных линий, известных специалистам в

30 данной области. Различные учреждения и компании разрабатывали клеточные линии для крупномасштабного получения антител, например для клинического использования. Не имеющими ограничительного характера примерами таких клеточных линий являются, среди прочего, клетки CHO, клетки NS0, или клетки PER.C6, или клетки HEK293. В особенно предпочтительном варианте осуществления указанная клетка представляет

35 собой человеческую клетку. Предпочтительно клетка представляет собой клетку, трансформированную областью E1 аденовируса или ее функциональным эквивалентом.

В предпочтительном варианте осуществления указанная клетка представляет собой клетку CHO или ее вариант. Предпочтительным является вариант, в котором для экспрессии антитела используют векторную систему, содержащую ген глутаминсинтетазы (GS). В одном предпочтительном варианте осуществления клетка представляет собой клетку CHO.

Клетки могут быть снабжены нуклеиновой кислотой, которая кодирует антитела. Клетки будут экспрессировать, собирать и экскретировать образованные антитела в супернатант клеточных культур. Введение одной тяжелой и легкой цепи (или, скорее, нуклеиновой кислоты, кодирующей ее) приводит к продукции моноклонального антитела, которое имеет две тяжелые цепи, каждая из которых связана с легкой цепью.

Способ изобретения можно осуществлять со смесями клеток, содержащими два или более видов клеток, каждый из которых продуцирует различные антитела. Преимущество использования такой смеси заключается в возможности более эффективной дальнейшей обработки собранных антител. Дополнительным преимуществом способа является сбор и очистка антительных продуктов как единого целого. Кроме того, смесь двух или более антител, полученных способом изобретения, может уменьшать число тестов, необходимых для получения одобрения регулирующими органами, по сравнению с числом тестов, необходимых для каждого из антител по отдельности.

В дополнительном варианте осуществления клетки представляют собой однородный набор клеток, состоящий по существу из копий одиночной клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую соответствующие антитела. Коэкспрессия нескольких тяжелых цепей в клетке позволяет использовать различные комбинации тяжелых цепей. Комбинация с дополнительными легкими цепями увеличивает число комбинаций. Разработаны различные способы, способствующие образованию конкретных комбинаций по сравнению с прочими. Получены варианты тяжелой цепи, которые специфически способствуют образованию гетеродимеров тяжелой цепи по сравнению с гомодимерами или наоборот гомодимеров тяжелой цепи по сравнению с гетеродимерами. Тяжелые цепи со специфическими доменами гомо- или гетеродимеризации уменьшают число антител, продуцируемых такими клетками, и/или повышают концентрацию предпочтительного антитела по сравнению с альтернативной комбинацией (например, большее продуцирование гетеродимера по сравнению с гомодимером).

Способ изобретения особенно подходит для получения двух или более мультиспецифических антител, включая биспецифические антитела. В данной области известны различные способы получения биспецифических антител. В одном подходе

5 используют общую легкую цепь, которая может образовывать функциональные переменные домены с различными тяжелыми цепями. Один предпочтительный способ получения биспецифических антител включает применение трансгенного животного, несущего в своем геноме общую цепь так, что при иммунизации такого животного антигеном образуется набор антител, специфичных к указанному антигену, на основании

10 необщей цепи, причем набор состоит из различных антител, содержащих указанную общую цепь и перестроенную когнатную цепь. Одно животное может быть иммунизировано различными антигенами, или различные животные могут быть иммунизированы каждым из соответствующих антигенов по отдельности. Нуклеиновые кислоты, кодирующие необщую цепь или ее переменную область, можно получать из

15 животного (-ых), например В-клеток, селезенки или лимфатической ткани. Их можно использовать для получения нуклеиновой кислоты, которая может экспрессировать соответствующие необщие цепи, которые затем можно вводить в продуцирующую клетку. Общую цепь можно вводить в одно и то же или в разное время. Нуклеиновую кислоту можно вводить в ядро и предпочтительно в геном клетки-хозяина так, чтобы

20 клетка-хозяин продуцировала мультиспецифические антитела или мультимеры, нацеленные на множество антигенов, к которым было (-и) иммунизировано (-ы) трансгенное (-ые) животное (-ые) (см., например, WO2009/157771, который включен в настоящий документ путем ссылки для создания переменных областей, которые можно комбинировать с общей цепью для получения функциональных переменных доменов,

25 специфичных к различным мишеням и/или различным эпитопам).

Клетка, которая продуцирует общую легкую цепь и две различные тяжелые цепи, каждая из которых может образовывать функциональный переменный домен с общей легкой цепью, продуцирует, среди прочего, биспецифическое антитело с двумя различными комбинациями тяжелой и легкой цепей. Аналогичным образом клетка,

30 которая продуцирует общую легкую цепь и три или более различных тяжелых цепей, может образовывать мультиспецифические антитела, способные нацеливаться на три или более антигенов, или комбинацию двух или более мультиспецифических антител, способных нацеливаться на три или более антигенов. В настоящее время возможно построение на стандартном формате антител (т. е. константный участок и два

35 переменных домена) и добавление дополнительных связывающих доменов. Таким образом, можно получать мультиспецифические антитела, у которых имеются один или

более одноцепочечных Fv с дополнительными специфичностями связывания, присоединенные к константному или одному или более переменных доменов антитела. Можно также получать тяжелые цепи с двумя или более переменными областями. Дополнительные области тяжелой цепи могут быть преимущественно связаны с различными или общими переменными областями легкой цепи. Пример приведен по US 62/650467, который включен в настоящий документ путем ссылки.

Если клетка продуцирует два или более мультиспецифических антитела, она может в некоторых случаях также продуцировать некоторое количество полуантител и антител с идентичными тяжелыми цепями или гомодимеров. Количество последних можно уменьшать путем включения модификаций, способствующих образованию гетеродимера, в тяжелые цепи. Как указано выше, существуют различные способы индуцирования гетеродимеризации тяжелых цепей. Соответствующие домены с модификациями в совокупности называются доменами гетеродимеризации. Тяжелые цепи, которые имеют домены гетеродимеризации, которые способствуют взаимодействию, считаются имеющими совместимые домены гетеродимеризации. Совместимые домены гетеродимеризации предпочтительно представляют собой совместимые домены гетеродимеризации тяжелой цепи CH3 иммуноглобулина. В данной области описаны различные способы, которыми можно обеспечивать такую гетеродимеризацию тяжелых цепей CH3.

Один предпочтительный способ продуцирования биспецифических антител описан в US 9,248,181 и US 9,358,286. В частности, предпочтительными изменениями для продуцирования по существу только молекул биспецифического полноразмерного IgG являются аминокислотные замены L351K и T366K (нумерация EU) в первом домене CH3 (тяжелая цепь «варианта KK») и аминокислотные замены L351D и L368E во втором домене (тяжелая цепь «варианта DE»), или наоборот. Как было описано ранее, вариант DE и вариант KK предпочтительно объединяются в пару с образованием гетеродимеров (так называемых биспецифических молекул DEKK). Гомодимеризация варианта DE тяжелых цепей (гомодимеры DEDE) или варианта KK тяжелых цепей (гомодимеры KKKK) происходит с трудом, в том числе вследствие сильного отталкивания друг от друга заряженных остатков в области контакта CH3–CH3 между идентичными тяжелыми цепями.

В настоящем изобретении предпочтительно, чтобы клетки были снабжены нуклеиновой кислотой, которая кодирует общую легкую цепь. Специалисту в данной

области известны различные способы получения антител, имеющих различные
 переменные области тяжелой цепи, но одинаковые переменные области легкой цепи.
 В WO2004/106375 описаны фаговые библиотеки, в которых используют общую
 переменную область легкой цепи. Фаговые селекции позволяют получать переменные
 5 домены с одной и той же переменной областью легкой цепи и разными переменными
 областями тяжелой цепи. Не относящиеся к человеку животные, имеющие общую цепь и
 разные когнатные цепи, дополнительно описаны в WO2009/157771. Селекции антител у
 таких животных позволяют получать переменные домены с идентичными или схожими
 переменными областями общей цепи и разными переменными областями когнатной
 10 цепи. WO2004/106375 и WO2009/157771 включены в настоящий документ путем ссылки.
 Публикации относятся, в частности, к созданию антител и нуклеиновой кислоты,
 кодирующей такие антитела, которые имеют идентичные или схожие переменные
 области общей цепи и различные переменные области когнатной цепи,
 предпочтительно общую переменную область легкой цепи и различные переменные
 15 области тяжелой цепи.

В одном предпочтительном варианте осуществления клетка продуцирует две или
 более тяжелых цепей и общую легкую цепь. Соответствующие тяжелая и легкая цепи
 могут иметь одну или более переменных областей, связанных с соответствующими
 20 цепями. В предпочтительном варианте осуществления клетка продуцирует три или более
 тяжелых цепей. Одна из трех тяжелых цепей предпочтительно содержит одну часть
 совместимого домена гетеродимеризации. Две или более других тяжелых цепей
 предпочтительно содержат другую часть совместимого домена гетеродимеризации. Если
 первая тяжелая цепь символично представлена буквой «А», а две другие тяжелые цепи
 25 буквами «В» и «С», конкретная комбинация доменов гетеродимеризации приводит к
 образованию преимущественно комбинаций АВ и АС. Комбинации АА, ВВ, СС и ВС
 практически не образуются при включении доменов гетеродимеризации. Такая клетка
 эффективно продуцирует только два биспецифических антитела АВ и АС (см. Фиг. 1). В
 настоящем изобретении предпочтительно, чтобы клетка продуцировала два антитела
 30 путем продуцирования по меньшей мере 3 тяжелых цепей. В предпочтительном варианте
 осуществления одна из указанных тяжелых цепей содержит одну часть совместимого
 домена гетеродимеризации, а указанные две или более других тяжелых цепей
 предпочтительно содержат другую часть совместимого домена гетеродимеризации.
 Тяжелая цепь, которая является общей для двух или более би- или мультиспецифических
 35 антител или мультимеров в композиции, предпочтительно имеет часть CH3 DE домена

гетеродимеризации. Другие тяжелые цепи в би- или мультиспецифических антителах предпочтительно имеют часть КК СНЗ.

По меньшей мере два антитела предпочтительно представляют собой мультиспецифические антитела, предпочтительно биспецифические антитела. В предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере два из указанных антител имеют одинаковую тяжелую цепь. Клетка может продуцировать несколько наборов биспецифических антител путем включения различных доменов гетеродимеризации в тяжелые цепи. Такие реализации могут приводить к преобладающему продуцированию биспецифических антител с комбинациями АВ и CD тяжелых цепей. Комбинация АВ может быть предпочтительно образована путем использования домена гетеродимеризации DE/КК, как указано выше в настоящем документе, и CD посредством включения домена гетеродимеризации «выступ во впадину» или использования других элементов гетеродимеризации, известных в данной области, например путем оптимизации заряда. Общую тяжелую цепь между различными би- или мультиспецифическими мультимерами или комбинациями антител с общей тяжелой цепью можно получать путем обеспечения общей тяжелой цепи с одной частью домена гетеродимеризации и различных комбинированных цепей с комплементарной частью домена гетеродимеризации. Например, часть СНЗ DE в общей тяжелой цепи и часть СНЗ КК в комбинированных цепях. В данном случае одна общая тяжелая цепь и две комбинированные тяжелые цепи приведут к продуцированию клеткой би- или мультиспецифического мультимера или антител с комбинациями АВ и АС тяжелых цепей (или АхВС и АхDE в случае мультиспецифических мультимеров). Другими возможными комбинациями являются АВ, АЕ, CD и CF; или АВ, АЕ, AG и CD и т. д.

Антитела по существу имеют отличительную изоэлектрическую точку (как правило, в диапазоне рН 6–10) по сравнению с другими белками клетки-хозяина. Антитела, такие как мультиспецифические антитела, а также мультиспецифические мультимеры, могут быть очищены с относительно высокой чистотой с помощью способов, описанных в настоящем документе. Способы могут включать ряд стадий, таких как культивирование клетки-хозяина, очистка выросших в культуре клеток с последующим захватом белка. Для удаления ДНК клетки-хозяина можно применять ИЕХ-хроматографию, такую как анионообменная хроматография, а катионообменную хроматографию (СІЕХ) можно применять, например, для удаления белка клетки-хозяина, выселяемого белка А и потенциальных агрегатов. Могут быть включены дополнительные стадии, такие как фильтрация вирусов или гидрофобная хроматография.

Как правило, антитела экскретируются продуцирующими клетками. Получение таких антител, как правило, включает сбор супернатанта клеток с последующими несколькими стадиями очистки для удаления клеточных остатков или агрегатов, присутствие которых нежелательно. Очистка выросших в культуре клеток может

5 включать фильтрование или центрифугирование (или их комбинацию) супернатанта культуры антителопродуцирующих клеток. Захват белков антител обычно выполняют путем аффинной очистки. Ее можно выполнять различными способами. Часто она включает очистку с применением колонок, содержащих рекомбинантный белок А, белок G или белок L, являющиеся бактериальными белками с известной

10 высокоспецифичной связывающей способностью по отношению к антителам. В настоящее время доступны различные оптимизированные мутанты, которые более специфически связываются с антителами. Например, доступен рекомбинантный белок А, из которого удалены ненужные домены, доступен рекомбинантный белок G с удаленным сайтом связывания с альбумином, а также модифицированный белок L. Связанные

15 антитела можно собирать путем элюирования одной или более таких колонок. Анионообменную хроматографию и катионообменную хроматографию можно использовать для дополнительной очистки препаратов, например для очистки биспецифических или мультиспецифических антител от полуантител, и/или гомодимерных антител, и/или других нежелательных примесей, связанных с

20 антительным продуктом, если таковые имеются. Гидрофобная хроматография (HIC) часто используется в качестве альтернативной стадии доочистки в процессах очистки антител. HIC обеспечивает ортогональную селективность по отношению к ионообменной хроматографии и может быть эффективной стадией для удаления агрегатов и снижения содержания белка клеток-хозяев. В настоящем изобретении HIC можно использовать для

25 аналитических целей после завершения очистки двух или более би- или мультиспецифических антител или мультимеров для последующей количественной оценки двух или более видов, имеющих сходное, предпочтительно по существу одинаковое время удерживания при IEX и/или сходную, предпочтительно по существу одинаковую pI. Таким образом, HIC используют для количественного определения

30 относительных количеств очищенных молекул.

Смолу для гидрофобного взаимодействия выбирают в качестве неподвижной фазы, а pH и/или проводимость подвижной фазы модулируют для достижения требуемой селективности. Антитела, как правило, притягивают положительный заряд при более низких значениях pH, что влияет на его полярность и общую поверхностную

35 гидрофобность. Можно выбирать такие условия pH, которые обеспечивают разделение двух или более антител в препарате.

В некоторых вариантах осуществления собранные антитела сначала отделяют от других белков посредством аффинной очистки, предпочтительно посредством экстракции белком А. Затем аффинно очищенные антитела пропускают через анионообменную колонку в условиях, при которых антитела собираются в проточной фракции. Антитела могут затем проходить через одну или более колонок СІЕХ.

Предпочтительный способ получения по меньшей мере двух антител осуществляют путем продуцирования их клетками в виде одной композиции, которая содержит два или более антител.

Способ получения по меньшей мере двух антител предпочтительно включает культивирование клетки-хозяина, продуцирующей два или более антител, сбор супернатанта клеток, обработку собранного супернатанта с использованием процесса очистки выросших в культуре клеток, предпочтительно включающего фильтрацию с отбором по размеру пор, при которой захватываются агрегаты, такие как клетки или клеточные фрагменты, и проходят антительные продукты. Антитела собирают из культуральной жидкости путем аффинной хроматографии с использованием белка А. Антитело, связанное с содержащей белок смолой, элюируют из хроматографической колонки после воздействия низкого рН, а затем элюат нейтрализуют с помощью подходящего буфера.

В настоящем документе термин «изоэлектрическая точка (рІ)» означает рН, при котором средний суммарный заряд поверхности белка, т. е. потенциал двойного электрического слоя белка, составляет 0. Иными словами, термин означает точку, при которой группа белков диссоциирована таким образом, что число катионов и анионов совпадает, и, следовательно, суммарный заряд белка составляет 0.

В настоящем документе рІ вычисляют на основании первичной аминокислоты в соответствии с инструментом ExPASy, ProtParam, с использованием параметров по умолчанию на самую раннюю дату подачи (дата приоритета) настоящей заявки. ProtParam представляет собой инструмент, который позволяет вычислять различные физические и химические параметры для данного белка, сохраненного в Swiss-Prot или TrEMBL, или для введенной пользователем белковой последовательности. Рассчитанные параметры включают теоретическую рІ. Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.; Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005) pp. 571–607.

Суммарный поверхностный заряд белка изменяется при изменении рН образом, зависящим от рІ белка. При рН, равном рІ белка, белок не будет иметь суммарного

заряда. При рН ниже рI белок будет иметь суммарный положительный заряд. Если значение рН буфера выше рI белка, он будет иметь суммарный отрицательный заряд.

Значение рI белка может быть определено по его первичной аминокислотной последовательности и, следовательно, может быть рассчитано, после чего может быть
5 выбран буфер, обеспечивающий известный суммарный заряд для интересующего белка. Таким образом, выбирают отрицательно заряженную катионообменную смолу, когда исследуемый интересующий белок несет суммарный положительный заряд при рабочем рН.

Белки с различными значениями рI будут иметь различные уровни заряда при
10 заданном рН и, таким образом, будут иметь различные аффинности к положительно заряженным поверхностным группам на частицах анионообменной среды; следовательно, различные белки будут связываться со смолой с разной прочностью, что облегчает их разделение. Таким образом, путем получения гетеродимерных полипептидов, имеющих отличающуюся рI относительно гомодимера и загрязняющих
15 веществ, представляющих собой полуантитела, и/или других связанных с антительным продуктом примесей, гетеродимерные полипептиды могут быть легко очищены с применением стандартных методик элюирования, например с применением градиента рН, или с применением градиента соли или электропроводности при фиксированном рН, или комбинации градиента рН и электропроводности. В вариантах осуществления
20 изобретения константные части и легкие цепи в антителах по существу имеют одинаковую последовательность в различных антителах. Такие антитела, как правило, существенно отличаются только аминокислотной последовательностью переменных областей тяжелой цепи. Для таких антител обычно достаточно рассчитать рI переменных областей тяжелой цепи, как указано в настоящем документе. Затем
25 определяют расчеты и критерии с использованием рI переменных областей тяжелой цепи вместо рI (полу)антитела. Среднее значение рI переменных областей тяжелой цепи антитела определяет время удерживания антитела в колонке СІЕХ. Антитела могут иметь одинаковые или разные домены гетеродимеризации, если таковые имеются. Они предпочтительно имеют одинаковые домены гетеродимеризации. Антитела могут
30 дополнительно несколько отличаться по точной аминокислотной последовательности в константных частях.

В случае стадии (-й) ионообменной хроматографии (ІЕХ) это процесс разделения ионов и полярных молекул на основании их аффинности к ионообменнику. Его работа основана на множествах заряженных молекул, включая крупные белки, малые
35 нуклеотиды и аминокислоты. ІЕХ часто используют при очистке белка. Водорастворимые и заряженные белки образуют ионные связи с нерастворимой

неподвижной фазой. Затем связанные молекулы можно элюировать и собирать с использованием элюента с более высокой концентрацией ионов и/или другим значением pH. Концентрацию соли или pH можно изменять поэтапно; путем постепенного изменения подвижной фазы хроматографического цикла или их комбинации. Двумя типами ионообменной хроматографии являются анионообменная и катионообменная хроматография. В настоящем изобретении предпочтительной является катионообменная хроматография или (CIEХ). CIEХ антитела предпочтительно выполняют при физиологическом значении pH. Значение pH, как правило, находится в диапазоне 5–9, предпочтительно 6–8.

10 CIEХ обычно используют, когда интересующая молекула положительно заряжена при pH, применяемом для хроматографии. Молекула заряжена положительно, поскольку pH при хроматографии меньше pI молекулы. При таком типе хроматографии неподвижная фаза является отрицательно заряженной, и на нее загружаются положительно заряженные молекулы для их притяжения. Анионообменную хроматографию осуществляют, когда стационарная фаза имеет положительный заряд, а на нее загружаются отрицательно заряженные молекулы (т. е. pH при хроматографии выше pI) для их притяжения.

Антитело, такое как мультиспецифическое антитело, как правило, связывается с колонкой IEX на стадии связывания в условиях, способствующих связыванию антитела, например мультиспецифического антитела, с субстратом. Затем колонки IEX, как правило, промывают для удаления несвязанного материала. Элюирование из колонки выполняют на стадии элюирования. Время удерживания антитела, такого как мультиспецифическое антитело, как правило, рассчитывают от начала стадии элюирования. Это период времени, в течение которого антитело находится на колонке после начала фазы элюирования. Если образец содержит несколько соединений, каждое соединение в образце, как правило, будет находиться на колонке в течение различного времени в соответствии с его химической композицией, т. е. каждое из них будет иметь разное время удерживания. Значения времени удерживания обычно выражают в секундах или минутах.

30 Значения времени удерживания антител, таких как мультиспецифические антитела, предпочтительно по существу совпадают в способе изобретения. Различные антитела могут иметь разные значения времени удерживания в одной и той же колонке и в одних и тех же условиях. В настоящем изобретении было обнаружено, что антитела, такие как мультиспецифические антитела, могут быть выбраны или сконструированы так, чтобы их значения времени удерживания при IEX были достаточно схожими, чтобы
35 обеспечить совместную очистку двух или более антител, например двух или более

мультиспецифических антител, за один цикл хроматографии IEX. Значения времени удерживания, которые отклоняются на 10% или менее от средних значений времени удерживания отдельных антител, как правило, достаточно схожи для обеспечения совместной очистки двух или более антител, например двух или более

5 мультиспецифических антител, посредством одного цикла хроматографии IEX.

Подходящий способ ВЭЖХ CIEХ для очистки и/или анализа антител в соответствии с изобретением включает применение ионообменных колонок серии TSKgel SP-STAT (размер частиц 7 мкм, вн. диам. 4,6 мм x 10 см (дл.),

10 Tosoh 21964). Колонки заполняют непористыми частицами смолы для скоростного анализа высокого разрешения, а также выделения биомолекул. Частицы в колонках TSKgel STAT содержат сеть с открытым доступом многослойных ионообменных групп для увеличения загрузочной способности, а размер частиц позволяет использовать эти колонки для систем ВЭЖХ и FPLC.

15 Подходящий способ включает уравнивание TSKgel SP-STAT (размер частиц 7 мкм, вн. диам. 4,6 мм x 10 см (дл.), Tosoh 21964) с использованием буфера А (натрий-фосфатный буфер, 25 мМ, рН 6,0), после чего антитела вытесняют из колонки путем повышения концентрации соли и создания градиента буфера В (25 мМ фосфата натрия, 1

20 мМ NaCl, рН 6,0). Скорость потока устанавливают равной 0,5 мл/мин. Масса вводимых исследуемых образцов и контролей составляет 10 мкг, а вводимые объемы составляют 10–100 мкл. Хроматограммы анализируют в отношении структуры пиков, значений времени удерживания и площадей основных пиков, наблюдаемых на основании результатов оценки при 220 нм. Способ можно масштабировать для анализа больших

25 количеств антитела.

Типичные графики CIEХ-хроматографических анализов препаратов антител показаны на Фиг. 2. Антитела для этого анализа собирали из трансфицированных клеток, как указано в примерах, и очищали от многих других белков в среде на колонке с

30 белком А. Антитела элюировали путем элюирования кислотой с последующей нейтрализацией и заменой буфера на PBS (рН 7,4), как указано в примерах. Затем образец препарата антитела загружали в колонку CIEХ. После промывки связанные белки элюировали путем применения градиента соли. Условия CIEХ для образцов на Фиг. 2А и Фиг. 2В были одинаковыми. Время удерживания рассчитывают для верхней части пика

35 биспецифического антитела. Время удерживания двух или более антител, таких как мультиспецифические антитела, предпочтительно отличается на 10% или менее от

среднего значений времени удерживания двух или более антител. При отклонении более 10%, как правило, антитела неэффективно отделяются от полуантител и, необязательно в случае мультиспецифических антител, от гомодимеров и/или других примесей, связанных с антительным продуктом. В предпочтительном варианте осуществления значения времени удерживания двух или более антител отличаются на 9% или менее от среднего значений времени удерживания двух антител. Предпочтительно на 8%, 7%, 6% или 5% или менее от среднего значений времени удерживания двух или более антител. В предпочтительном варианте осуществления значения времени удерживания двух или более антител отличаются на 4% или менее от среднего значений времени удерживания двух или более антител. Предпочтительно 3% или менее, предпочтительно 2% или менее. При более схожих значениях времени удерживания, как правило, мультиспецифические антитела более эффективно отделяются от полуантител и необязательно гомодимеров и/или других примесей, связанных с антительным продуктом, и, таким образом, обеспечивается более чистый сбор двух антител в фракциях колонки IEX.

15

В средствах и способах изобретения среднее значений времени удерживания двух или более антител, таких как два или более мультиспецифических антител, рассчитывают для совместно собираемых или очищаемых антител. Таким образом, в вариантах осуществления, в которых подлежащие очистке антитела являются мультиспецифическими антителами, среднее значений времени удерживания двух или более антител рассчитывают на основании мультиспецифических антител. Значения времени удерживания антител, которые не подлежат сбору, таких как гомодимерные антитела, не применяют для вычисления среднего значения.

Антитела, такие как мультиспецифические антитела, могут быть отобраны для совместной очистки в способе изобретения путем отбора антител, таких как мультиспецифические антитела, которые имеют по существу одинаковые значения времени удерживания IEX, в условиях, используемых для IEX. Антитела, такие как мультиспецифические антитела, можно также усовершенствовать путем соответствующей модификации одной или более переменных областей так, чтобы они имели по существу одинаковые значения времени удерживания при IEX в тех же или аналогичных условиях, используемых для IEX.

В одном варианте осуществления полученные антитела, предназначенные для совместной очистки, такие как би- и/или мультиспецифические антитела, имеют сходные рI. Изoeлектрическая точка (pI) по меньшей мере двух из указанных антител предпочтительно отличается на 0,4 единицы, 0,3, 0,2 и предпочтительно 0,1 единицы или

35

менее от средней rI указанных по меньшей мере двух антител. Значение rI каждого из указанных по меньшей мере двух антител предпочтительно отличается друг от друга на 0,25 единицы или менее.

Небольшое или отсутствующее различие в rI антител, как правило, обеспечивает хорошую совместную очистку. Преимуществом является то, что rI соответствующих полуантител в антителе существенно отличаются от среднего значения. Это различие облегчает хорошее разделение полуантител от «совместно» перемещающихся полных антител на стадии хроматографии СЕХ.

В вариантах осуществления, в которых антитела, предназначенные для совместной очистки, представляют собой би- или мультиспецифические антитела, предпочтительно, чтобы rI переменных доменов в пределах каждого из антител, предназначенных для совместной очистки, отличались более чем на 0,2, предпочтительно 0,3, предпочтительно 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 1,0, 1,2, 1,4, предпочтительно более чем на 1,8 или 2,0 единицы от среднего значения rI переменных доменов другого (-их) антитела (антител), подлежащего (-их) совместной очистке. В этом варианте осуществления различие в rI переменных доменов в антителе предпочтительно по меньшей мере на 0,2 единицы больше различия между x и y , предпочтительно на по меньшей мере 0,3, 0,4, 0,5, предпочтительно по меньшей мере на 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 2,0 или 2,5 больше различия между x и y , где x представляет собой среднее значение rI двух переменных доменов первого из указанных антител, а y представляет собой среднее значение rI двух переменных доменов второго из указанных антител. При этом упомянутое различие в rI переменных доменов в антителе, как правило, указывает на хорошее отделение связанных с антительным продуктом примесей от антител, предназначенных для совместной очистки, и/или хорошее отделение от моноспецифических антител.

Некоторые композиции, содержащие два или более би- или мультиспецифических антител, имеют константные области и легкие цепи, сходные по аминокислотной последовательности или имеющие по существу идентичную аминокислотную последовательность. Такие два или более би- и/или мультиспецифических антител, как правило, отличаются друг от друга по существу только аминокислотной последовательностью переменных доменов или по существу только переменными областями тяжелой цепи. В таких случаях часто нет необходимости определять rI всего антитела. Вместо этого можно определять rI переменных доменов и/или rI переменных областей тяжелой цепи. Таким образом обеспечено средство оценки того, могут ли антитела перемещаться рядом друг с другом

на стадии хроматографии СІЕХ, иными словами, имеют ли антитела достаточно схожие значения времени удерживания для обеспечения совместной очистки.

В одном варианте осуществления способа или композиции, описанных в настоящем документе, два или более би- или мультиспецифических антитела имеют константные области и легкие цепи, имеющие одинаковую аминокислотную последовательность или имеющие по существу идентичные аминокислотные последовательности. Два или более би- или мультиспецифических антитела могут быть совместно очищены на стадии хроматографии СІЕХ, когда средние значения pI переменных доменов в каждом антителе отличаются на 0,7 единицы или менее от среднего pI переменных доменов соответствующих антител, предназначенных для совместной очистки. В предпочтительном варианте осуществления среднее значение x значений pI двух переменных доменов первого из указанных антител и среднее значение y значений pI двух переменных доменов второго из указанных антител отличаются на 0,6 единицы или менее, предпочтительно на 0,5 единицы или менее, от средних значений x и y первого и второго антител, предназначенных для совместной очистки. x и y предпочтительно на 0,4; предпочтительно на 0,3; предпочтительно на 0,2 и предпочтительно на 0,1 единицы или менее отличаются от средних значений x и y первого и второго антител, предназначенных для совместной очистки. Такие би- и/или мультиспецифические антитела, как правило, имеют по существу одинаковые значения времени удерживания. В этом варианте осуществления константные области антител по существу являются одинаковыми. Значения pI , и в частности средние значения x и y таких антител, указывают на значения pI соответствующих антител в целом. В этом варианте осуществления предпочтительно, чтобы pI переменных доменов в каждом из антител, предназначенных для совместной очистки, отличались более чем на 0,2, предпочтительно 0,3, предпочтительно 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 1,0, 1,2, 1,4, предпочтительно более чем на 1,8 или 2,0 единицы от среднего значения pI переменных доменов в антителе. В этом варианте осуществления различие в pI переменных доменов в антителе предпочтительно по меньшей мере на 0,2 единицы больше разницы между x и y , предпочтительно по меньшей мере на 0,3, 0,4, 0,5, предпочтительно по меньшей мере на 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 2,0 или 2,5 больше разницы между x и y . Упомянутое различие в pI переменных доменов в антителе, как правило, обозначает хорошее отделение полуантител от антител, предназначенных для совместной очистки, и/или хорошее отделение от моноспецифических антител.

В одном варианте осуществления способа или композиции, описанных в настоящем документе, два или более би- или мультиспецифических антитела имеют

константные области и легкие цепи, имеющие одинаковую аминокислотную последовательность или имеющие по существу идентичные аминокислотные последовательности. Два или более би- или мультиспецифических антитела могут быть совместно очищены на стадии хроматографии CIEХ, когда средние значения rI 5 переменных областей тяжелой цепи в каждом антителе отличаются на 0,7 единицы или менее от среднего rI переменных областей тяжелой цепи соответствующих антител, предназначенных для совместной очистки. В предпочтительном варианте осуществления среднее значение m значений rI двух переменных областей тяжелой цепи первого из указанных антител и среднее значение n значений rI двух переменных областей 10 тяжелой цепи второго из указанных антител отличаются на 0,6 единицы или менее, предпочтительно на 0,5 единицы или менее, от средних значений m и n первого и второго антител, предназначенных для совместной очистки. m и n предпочтительно на 0,4; предпочтительно на 0,3; предпочтительно на 0,2 и предпочтительно на 0,1 единицы или менее отличаются от средних значений m и n первого и второго антител, 15 предназначенных для совместной очистки. Такие би- и/или мультиспецифические антитела, как правило, имеют по существу одинаковые значения времени удерживания. В этом варианте осуществления константные области антител по существу являются одинаковыми. Значения rI , и в частности средние значения m и n таких антител указывают на значения rI соответствующих антител в целом. В этом варианте 20 осуществления предпочтительно, чтобы rI переменных областей тяжелой цепи в каждом из антител, предназначенных для совместной очистки, отличались более чем на 0,2, предпочтительно 0,3, предпочтительно 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 1,0, 1,2, 1,4, предпочтительно более чем на 1,8 или 2,0 единицы от среднего значения rI переменных областей тяжелой цепи в антителе. В этом варианте осуществления разница в rI переменных 25 областей тяжелой цепи в антителе предпочтительно на по меньшей мере 0,2 единицы больше разницы между m и n , предпочтительно на по меньшей мере 0,3, 0,4, 0,5, предпочтительно на по меньшей мере 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 2,0 или 2,5 больше разницы между m и n . Упомянутое различие в rI переменных областей тяжелой цепи в антителе, как правило, указывает на хорошее отделение полуантител от антител, 30 предназначенных для совместной очистки, и/или хорошее отделение от моноспецифических антител.

Антитела, такие как мультиспецифические антитела, могут иметь или быть отобранными по наличию комбинаций тяжелой и легкой цепей (полуантитела) или гомодимеров (например, моноспецифические антитела) или других связанных с 35 антителым продуктом примесей, у которых значения времени удерживания существенно отличаются от значений времени удерживания полных антител или

требуемых антител, таких как мультиспецифические антитела, в используемых условиях IEX. В вариантах осуществления, в которых клетка экспрессирует общую легкую цепь, селекция, как правило, находится на тяжелой цепи. Тяжелые цепи можно модифицировать таким образом, чтобы полуантитела или гомодимеры имели совершенно
 5 разные значения времени удерживания. В предпочтительном варианте осуществления значения времени удерживания полуантител и/или гомодимеров отличаются на более чем 10% от среднего значений времени удерживания соответствующих антител или мультиспецифических антител. В предпочтительном варианте осуществления среднее значение pI отдельных комбинаций тяжелой и легкой цепей антитела, которые не
 10 подлежат совместной очистке, отличается более чем на 0,5 единицы от среднего значения pI указанных тяжелой и легкой цепей по меньшей мере двух совместно очищаемых антител.

В изобретении дополнительно обеспечена композиция, содержащая 2–10
 15 рекомбинантных антител, получаемых способом, описанным в настоящем документе. Кроме того, обеспечена композиция, содержащая 2–10 рекомбинантных антител, отличающаяся тем, что значения времени удерживания при IEX по меньшей мере двух из указанных антител совпадают.

В изобретении дополнительно обеспечена композиция, содержащая 2–10
 20 рекомбинантных антител, отличающаяся тем, что pI по меньшей мере двух из указанных антител отличается на 0,4 единицы, 0,3, 0,2 и предпочтительно 0,1 единицы или менее от средней pI указанных по меньшей мере двух антител. Значение pI каждого из указанных по меньшей мере двух антител предпочтительно отличается друг от друга на
 25 0,25 единицы или менее.

В изобретении дополнительно предложена композиция, содержащая 2–10
 рекомбинантных антител, отличающаяся тем, что среднее значение x значений pI двух
 30 переменных доменов первого антитела и среднее значение y значений pI двух переменных доменов второго антитела отличаются на 0,7, 0,6 и предпочтительно 0,5 единицы или менее, от средних значений x и y первого и второго антител, предназначенных для совместной очистки. x и y предпочтительно на 0,4; предпочтительно на 0,3; предпочтительно на 0,2 и предпочтительно на 0,1 единицы или
 35 менее отличаются от средних значений x и y первого и второго антител, предназначенных для совместной очистки. Такие антитела, например мультиспецифические антитела, как правило, имеют по существу одинаковые значения

времени удерживания. В этом варианте осуществления константные области антител по существу являются одинаковыми. Значения rI , и в частности среднее значение rI различных переменных доменов антитела, каждый из которых содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, отражает rI полного антитела.

В изобретении дополнительно обеспечена композиция, содержащая 2–10 рекомбинантных антител, отличающаяся тем, что среднее значение m значений rI двух переменных областей тяжелой цепи двух переменных доменов первого антитела и среднее значение n значений rI двух переменных областей тяжелой цепи двух переменных доменов второго антитела отличаются на 0,7, 0,6 и предпочтительно 0,5 единицы или менее, от средних значений m и n первого и второго антител, предназначенных для совместной очистки. m и n предпочтительно на 0,4; предпочтительно на 0,3; предпочтительно на 0,2 и предпочтительно на 0,1 единицы или менее отличаются от средних значений m и n первого и второго антител, предназначенных для совместной очистки. Такие антитела, например мультиспецифические антитела, как правило, имеют по существу одинаковые значения времени удерживания. В этом варианте осуществления константные области и переменные области легкой цепи антител по существу одинаковы. Значения rI , и в частности среднее значение rI различных переменных областей тяжелой цепи антитела отражает rI полного антитела.

В предпочтительном варианте осуществления значения времени удерживания при IEX и/или rI предпочтительно по существу одинаковы для всех собираемых в композиции антител. В предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере два из антител представляют собой биспецифические антитела. Предпочтительно по меньшей мере два из указанных антител имеют одинаковую тяжелую цепь.

В некоторых вариантах осуществления общая переменная область легкой цепи одной или обеих областей связывания VH/VL содержит V-сегмент переменной области IgV κ 1-39*01 зародышевой линии. В определенном варианте осуществления переменная область легкой цепи одной или обеих областей связывания VH/VL содержит V-сегмент легкой каппа-цепи IgV κ 1-39*01. IgV κ 1-39 представляет собой сокращение от гена переменной каппа-цепи иммуноглобулина 1–39. Ген также известен как переменный участок каппа иммуноглобулина 1–39; IGKV139; IGKV1-39. Внешними идентификаторами для гена являются HGNC: 5740; Entrez Gene: 28930;

Ensembl: ENSG00000242371. Аминокислотная последовательность для V-области приведена в SEQ ID NO: 25. V-область может быть скомбинирована с одной из пяти J-областей. Предпочтительные J-области представляют собой jk1 и jk5, а соединенные последовательности обозначены как IGKV1-39/jk1 и IGKV1-39/jk5; альтернативными названиями являются IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01 или IgV κ 1-39*01/IGJ κ 5*01 (номенклатура дана в соответствии с базой данных IMGT, Интернет-адрес imgt.org). В определенных вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи одной или обеих областей связывания VH/VL содержит легкую каппа-цепь IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01 или IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*05 (SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27 соответственно).

10

В некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи одной или обеих областей связывания VH/VL биспецифического антитела содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность QSISSY (SEQ ID NO: 22), LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность AAS, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность QQSYSTP (SEQ ID NO: 24) (т. е. области CDR последовательности IGKV1-39 в соответствии с IMGT). В некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи одной или обеих областей связывания VH/VL биспецифического антитела содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность QSISSY (SEQ ID NO: 22), LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность AASLQS (SEQ ID NO: 23), и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность QQSYSTP (SEQ ID NO: 24).

20

В некоторых вариантах осуществления одна или обе области связывания VH/VL биспецифического антитела содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90%, предпочтительно на по меньшей мере 95%, более предпочтительно на по меньшей мере 97%, более предпочтительно на по меньшей мере 98%, более предпочтительно на по меньшей мере 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления одна или обе области связывания VH/VL биспецифического антитела содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90%, предпочтительно на по меньшей мере 95%, более предпочтительно на по меньшей мере 97%, более предпочтительно на по меньшей мере 98%, более предпочтительно на по меньшей мере 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 27.

30

35

Например, в некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи одной или обеих областей связывания VH/VL биспецифического антитела может иметь от 0 до 10, предпочтительно от 0 до 5 аминокислотных вставок, делеций, замен, добавлений или их комбинацию по отношению к SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 27. В

5 некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи одной или обеих областей связывания VH/VL биспецифического антитела содержит от 0 до 9, от 0 до 8, от 0 до 7, от 0 до 6, от 0 до 5, от 0 до 4, предпочтительно от 0 до 3, предпочтительно от 0 до 2, предпочтительно от 0 до 1 и предпочтительно 0 аминокислотных вставок, делеций, замен, добавлений по отношению к указанной аминокислотной последовательности или

10 их комбинацию.

В других вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи одной или обеих областей связывания VH/VL биспецифического антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 27. В

15 определенных вариантах осуществления обе области связывания VH/VL биспецифического антитела содержат идентичные области VL. В одном варианте осуществления VL обеих областей связывания VH/VL биспецифического антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26. В одном варианте осуществления VL обеих областей связывания VH/VL биспецифического

20 антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27.

Биспецифические антитела, такие как описанные в способах настоящего изобретения, могут быть представлены в нескольких форматах. В данной области

25 известно множество различных способов получения биспецифических антител. Например, форматы биспецифического антитела, не являющиеся классическими антителами с двумя комбинациями VH/VL, имеют по меньшей мере вариабельный домен, содержащий вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи. Этот вариабельный домен может быть связан с одноцепочечным Fv-фрагментом, мономером, VH и Fab-фрагментом, который обеспечивает вторую связывающую

30 активность.

Биспецифические антитела, такие как описанные в способах, предложенных в настоящем документе, по существу представляют собой человеческие антитела

35 подкласса IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). В определенных вариантах осуществления антитела относятся к человеческим антителам подкласса IgG1.

Полноразмерные антитела IgG предпочтительны из-за подходящего периода полужизни и в связи с низкой иммуногенностью. Соответственно, в определенных вариантах осуществления биспецифические антитела представляют собой молекулу полноразмерного IgG. В варианте осуществления биспецифические антитела
5 представляют собой молекулы полноразмерного IgG1.

В определенных вариантах осуществления антитела содержат кристаллизующийся фрагмент (Fc). Fc-фрагменты биспецифических антител предпочтительно состоят из человеческой константной области. Константная область или
10 Fc биспецифических антител может содержать одно или более, предпочтительно не более 10, предпочтительно не более 5 аминокислотных различий по сравнению с константной областью человеческого антитела природного происхождения. Например, в определенных вариантах осуществления каждое Fab-плечо биспецифических антител может дополнительно включать область Fc, содержащую модификации, способствующие
15 образованию биспецифического антитела, модификации, влияющие на опосредованные Fc эффекторные функции, и/или другие признаки, описанные в настоящем документе.

В одном аспекте обеспечена фармацевтическая композиция, содержащая два или более антител, описанных в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый
20 носитель. При использовании в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный государственным регулирующим органом или перечисленный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных, в частности у людей, и включает всевозможные растворители, соли, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты,
25 изотонические и замедляющие поглощение агенты и т. п., которые физиологически совместимы. Термин «носитель» относится к разбавителю, адъюванту, эксципиенту или несущей среде, вместе с которыми вводят соединение. Фармацевтические носители могут быть стерильными жидкостями, такими как вода или масла, включая масла, получаемые из нефти, масла растительного, животного или синтетического происхождения, например
30 арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло, глицеролполиэтиленгликольрицинолеат и т. п. В качестве носителей, в частности, для инъекционных растворов, можно использовать воду или водные солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина. Жидкие композиции для парентерального введения могут быть приготовлены для введения путем инъекции или непрерывной
35 инфузии. Способы введения путем инъекции или инфузии включают интравезикальный, интратуморальный, внутривенный, внутрибрюшинный, внутримышечный,

подоболочечный и подкожный. В зависимости от способа введения (например, внутривенно, подкожно, внутрь сустава и т. п.) активное соединение может быть покрыто материалом для его защиты от действия кислот и других естественных условий, которые могут инактивировать соединение.

- 5 Фармацевтические композиции, подходящие для введения человеческим пациентам, как правило, приготовлены для парентерального введения, например, в жидком носителе, или подходят для разведения в жидком растворе или суспензии для внутривенного введения. Композиции могут быть приготовлены в виде единичной лекарственной формы для упрощения введения и единообразия дозы.

10

Кроме того, включены твердые препараты, предназначенные для превращения, непосредственно перед использованием, в жидкие препараты для перорального или парентерального введения. Такие жидкие формы включают растворы, суспензии и эмульсии.

15

- «Биспецифическое антитело» представляет собой антитело, описанное в настоящем документе, в котором один домен антитела связывается с первым антигеном, а второй домен антитела связывается со вторым антигеном, причем указанные первый и второй антигены не являются идентичными. Термин «биспецифическое антитело» также охватывает антитела, в которых одна комбинация вариабельной области тяжелой цепи / вариабельной области легкой цепи (VH/VL) связывается с первым эпитопом на антигене, а вторая комбинация VH/VL связывается со вторым эпитопом. Термин дополнительно включает антитела, в которых VH способна специфически распознавать первый антиген, а VL, попарно соединенная с VH в вариабельной области иммуноглобулина, способна специфически распознавать второй антиген. Полученная пара VH/VL будет связываться с антигеном 1 или антигеном 2. Такие так называемые «антитела два в одном» описаны, например, в WO 2008/027236, WO 2010/108127 и публикации Schaefer et al (Cancer Cell 20, 472–486, October 2011). Биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением не ограничено каким-либо конкретным биспецифическим форматом или способом его получения.

30

- Термин «процент (%) идентичности», используемый в настоящем документе в отношении нуклеиновой кислоты или аминокислотных последовательностей, определяется как процентная доля остатков в потенциальной последовательности, идентичных остаткам в выбранной последовательности, после выравнивания последовательностей для оптимального сравнения. Процент идентичности

35

последовательностей для сравнения нуклеотидных последовательностей определяют с помощью приложения AlignX программного обеспечения Vector NTI Program Advance 10.5.2, используя настройки по умолчанию, в которых задействованы модифицированный алгоритм ClustalW (Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson T.J. (1994) Nuc. Acids Res. 22: 4673–4680), матрица вкладов swgapdnarnt, штраф за внесение гэпа равен 15, и штраф за удлинение гэпа равен 6,66. Аминокислотные последовательности выравнивают с помощью приложения AlignX программного обеспечения Vector NTI Program Advance 11.5.2, используя настройки по умолчанию, в которых задействован модифицированный алгоритм ClustalW (Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson T.J., 1994), матрица вкладов blosum62mt2, штраф за внесение гэпа равен 10, а штраф за удлинение гэпа равен 0,1.

Используемый в настоящем документе термин «общая легкая цепь» относится к двум легким цепям (или VL участкам) в биспецифическом антителе. Две легкие цепи (или VL участки) могут быть идентичными или могут иметь некоторые различия в аминокислотной последовательности, не приводящие к изменению специфичности связывания полноразмерного антитела. Термины «общая легкая цепь», «общая VL», «одиночная легкая цепь», «одиночная VL» с добавлением или без добавления термина «перестроенная» используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Термин «общая» также относится к функциональным эквивалентам легкой цепи, аминокислотные последовательности которых не являются идентичными. Существуют множество вариантов указанной легкой цепи, в которых присутствуют мутации (делеции, замены, вставки и/или добавления), которые не влияют на формирование функциональных связывающих областей. Легкая цепь настоящего изобретения может также представлять собой легкую цепь, как указано выше в настоящем документе, имеющую от 0 до 10, предпочтительно от 0 до 5 аминокислотных вставок, делеций, замен, добавлений или их комбинацию. Например, оставаясь в рамках объема определения общих легких цепей, используемого в настоящем документе, получают или обнаруживают легкие цепи, которые не являются идентичными, но сохраняют функциональную эквивалентность, например, посредством внедрения и исследования консервативных аминокислотных изменений, изменений аминокислот в областях, которые не влияют или лишь частично влияют на специфичность связывания при объединении в пару с тяжелой цепью, и т. п. Термин «полноразмерный IgG» или «полноразмерное антитело» в соответствии с изобретением означает содержание по существу полного IgG, при этом оно не обязательно обладает всеми функциями интактного IgG. Во избежание сомнений следует уточнить, что полноразмерный IgG

содержит две тяжелые и две легкие цепи. Каждая цепь содержит константную (C) и
 вариабельную (V) области, которые могут быть разделены на домены, обозначаемые
 CH1, CH2, CH3, VH и CL, VL. Антитело IgG связывается с антигеном посредством
 доменов вариабельной области, содержащихся в Fab-участке, и после связывания может
 5 взаимодействовать с молекулами и клетками иммунной системы через константные
 домены, в основном через Fc-участок. Полноразмерные антитела в соответствии с
 изобретением охватывают молекулы IgG, в которых могут присутствовать мутации,
 обеспечивающие требуемые характеристики. Полноразмерные IgG не должны иметь
 делеций или существенных участков любой из областей. Однако молекулы IgG, в
 10 которых удален один или несколько аминокислотных остатков, без существенного
 изменения характеристик связывания полученной молекулы IgG охватываются термином
 «полноразмерные IgG». Например, такие молекулы IgG могут иметь делецию от 1 до 10
 аминокислотных остатков, предпочтительно в областях, отличных от CDR, причем
 удаленные аминокислоты не являются обязательными для специфичности связывания
 15 IgG.

Поскольку антитело, как правило, распознает эпитоп антигена, такой эпитоп
 может присутствовать и в других соединениях, антитела в соответствии с настоящим
 изобретением, которые «специфически распознают» антиген, могут также распознавать
 20 другие соединения, если такие другие соединения содержат эпитоп аналогичного типа.
 Таким образом, термины «специфически распознает» в отношении взаимодействия
 антигена и антитела не исключают связывания антител с другими соединениями, которые
 содержат эпитоп аналогичного типа.

25 Термин «эпитоп» и «антигенная детерминанта» означают участок на антигене, с
 которым специфически связывается иммуноглобулин или антитело. Эпитопы могут быть
 образованы как из смежных аминокислот, так и несмежных аминокислот,
 расположенных рядом друг с другом в результате третичной укладки белка (так
 называемые линейные и конформационные эпитопы). Эпитопы, образованные из
 30 смежных линейных аминокислот, как правило, сохраняются под воздействием
 денатурирующих растворителей, тогда как конформация эпитопов, образованных в
 результате третичной укладки, как правило, нарушается при обработке
 денатурирующими растворителями. Эпитоп может обычно включать 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,
 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации.
 35 Способы определения пространственной конформации эпитопов известны специалистам
 в данной области и включают методики, известные в данной области, например

рентгеновскую кристаллографию, HDX-MS и двухмерный ядерный магнитный резонанс, Pepscan и аланиновое сканирование в зависимости от природы эпитопа (см., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

5

Для ясности и краткости описания в настоящем документе признаки описаны в составе одного и того же или отдельных вариантов осуществления, однако следует понимать, что объем изобретения может включать варианты осуществления, имеющие комбинации всех или некоторых из описанных признаков.

10

Чтобы настоящее описание было более понятным, сначала приведены определения конкретных терминов. Дополнительные определения представлены в подробном описании. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют общепринятое значение, понятное среднему специалисту в данной области, и применяются стандартные способы иммунологии, химии белка, биохимии, рекомбинантной ДНК и фармакологии.

15

При использовании в настоящем документе формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное.

20

Применение термина «включая», а также других форм, например «включают», «включает» и «включал», не имеет ограничительного характера.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

25 **Фиг. 1**

Схематическое представление вариантов осуществления, в которых композиция содержит два биспецифических антитела, имеющих общее плечо. На фигуре показаны антитела с тяжелыми цепями (1) и легкими цепями (4). Четыре тяжелые цепи имеют три различные переменные области (5, 6 и 7). Тяжелая цепь, которая имеет общую переменную область (5), имеет одну часть (3) домена гетеродимеризации. Тяжелые цепи с переменными областями (6) и (7) имеют совместимую часть домена (2) гетеродимеризации. Предпочтительное объединение в пару областей (2) и (3) гетеродимеризации может приводить к образованию биспецифических антител.

30

Фиг. 2

Панель А. Профиль СІЕХ при 220 нм биспецифического антитела PB4516, производственный номер 8 (p08). Панель В. Профиль СІЕХ при 220 нм биспецифического антитела PB6892, производственный номер 4 (p04).

5

Фиг. 3

Фиг. 3а. Профиль СІЕХ при 220 нм биспецифического антитела PB4516, производственный номер 10 (p10).

Фиг. 3b. Профиль СІЕХ при 220 нм биспецифического антитела PB11244, производственный номер 1 (p01).

Фиг. 3с. В колонке PB (PBXXXX(X)) идентифицированы два биспецифических антитела в каждом блоке. Варибельная область тяжелой цепи PB11244 и PB4516 указана в столбцах «Мишень 1» и «Мишень 2». Последовательность легкой цепи является одинаковой для всех антител и имеет аминокислотную последовательность общей легкой цепи IgKV1*39/jk1 SEQ ID NO: 26. Значение pI, рассчитанное с помощью инструмента ExPASy, ProtParam, указано для каждой варибельной области тяжелой цепи в столбцах pI. Различие в pI между двумя варибельными областями тяжелой цепи указано в последнем столбце, демонстрируя, что среднее различие в pI VH между PB11244 и PB4516 составляет 0,08.

20

Фиг. 4

Профиль СІЕХ при 220 нм препарата антитела в отдельной колонии cp12 пула FST2. Профиль СІЕХ показывает резкий пик совместно элюируемых антител PB4516 и PB11244. Профиль показывает, что образец содержит ограниченное количество связанных с продуктом примесей. Кроме того, он демонстрирует хорошее разделение между совместно элюируемыми биспецифическими антителами и отдельно перемещающимися связанными с продуктом примесями.

25

Фиг. 5

Профиль СІЕХ при 220 нм препарата антитела в колонии CP07. Колонии брали из набора отдельных колоний одной колонии FST2cp09. Второе субклонирование проводили, чтобы убедиться в том, что клеточная линия FST2cp09-cp07 представляла собой клональную клеточную линию. Специфический для биспецифического антитела ИФА указывал на присутствие 743 мкг/мл биспецифического антитела PB11244 к EGFR/HER2 и 1134 мкг/мл биспецифического антитела PB4516 к EGFR/HER3.

35

Фиг. 6

Время удерживания гомодимеров антитела (PGXXXX), имеющих два идентичных
 переменных домена. Аминокислотная последовательность переменной области
 тяжелой цепи имеет последовательность, указанную для MF на Фиг. 8, и общую легкую
 5 цепь IgKV1*39/jk1 с SEQ ID NO: 26.

Фиг. 7. В колонке PB (PBXXXX(X)) идентифицированы два биспецифических антитела в
 каждом блоке. Переменная область тяжелой цепи (MFXXXX) каждого из
 биспецифических антител указана в столбцах «Мишень 1» и «Мишень 2».

10 Последовательность легкой цепи является одинаковой для всех антител и имеет
 аминокислотную последовательность общей легкой цепи IgKV1*39/jk1 SEQ ID NO: 26.
 Значение pI, рассчитанное с помощью инструмента ExPASy, ProtParam, указано для
 каждой переменной области тяжелой цепи в столбцах pI. Различия в pI между двумя
 переменными областями тяжелой цепи и измеренным временем удерживания указано в
 15 последних двух столбцах. Измеренные значения времени удерживания и рассчитанные pI
 и среднее значение pI указывают на то, что пара биспецифических антител может
 эффективно совместно элюироваться при хроматографии CIEХ. Антитела имеют
 константные области IgG1 и общую легкую цепь. Представлена тяжелая цепь с общей
 переменной областью тяжелой цепи (идентичной MF) с тяжелой цепью CH3 DE или
 20 тяжелой цепью КК. Значения времени удерживания указаны для хроматографии CIEХ,
 выполненной для каждого биспецифического, а пример условий хроматографии CIEХ
 описывает раздел «Материалы и способы». Многие другие условия хроматографии CIEХ
 будут приводить к подходящим значениям времени удерживания для перечисленных пар
 биспецифических антител, имеющих предложенные значения pI.

25

Фиг. 8

Аминокислотная последовательность переменных областей тяжелой цепи (MFXXXX)
 соответствующих антител и CDR переменных областей легкой цепи и аминокислотная
 последовательность переменных областей общей легкой цепи.

30

ПРИМЕРЫ

Пример 1

5 Материалы и способы

Клеточные линии

НЕК293 и СНО-К1 выдерживали в питательной среде.

10 *Создание биспецифических антител*

Биспецифические антитела создавали с использованием собственной технологии СНЗ для обеспечения эффективной гетеродимеризации и образования биспецифического антитела. В технологии СНЗ применяют точечные мутации на основе заряда в области СНЗ для обеспечения эффективного объединения в пары двух различных молекул тяжелой цепи, как описано ранее (PCT/NL2013/050294; опубликовано под номером WO 2013/157954 A1).

Ген VH клонировали в одном из двух различных векторов каркаса IgG1. В зависимости от партнера по связыванию VH клонировали в каркасе IgG1, содержащем вариант СНЗ с вариантом гетеродимеризации DE, или в каркасе IgG1, содержащем комплементарный вариант гетеродимеризации СНЗ КК. В случае би- или мультиспецифических антител, в которых два или более антител имеют общую тяжелую цепь. Общая цепь предпочтительно имеет вариант гетеродимеризации СНЗ DE (также называемый тяжелой цепью DE), а две или более уникальных тяжелых цепей имеют вариант гетеродимеризации СНЗ КК (также называемый тяжелой цепью КК).

Клетки НЕК293 временно трансфицировали смесями ДНК-FUGENE и дополнительно культивировали. Через семь дней после трансфекции супернатант собирали и обновляли среду. Через четырнадцать дней после трансфекции супернатанты объединяли и фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Стерильный супернатант хранили при 4 °C. Приспособленные для суспензии клетки 293F культивировали во флаконах T125 на шейкере до получения плотности $3,0 \times 10^6$ клеток/мл. Клетки высевали с плотностью $0,3\text{--}0,5 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл в каждую лунку 24-луночного планшета с глубокими лунками. Клетки временно трансфицировали отдельными стерильными смесями ДНК: PEI-MIX и дополнительно культивировали.

Через семь дней после трансфекции супернатант собирали и фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Стерильный супернатант хранили при 4 °С.

Создание стабильных пулов клеточной линии, которые совместно экспрессируют два биспецифических антитела

Клетки CHO трансфицировали тремя конструктами тяжелой цепи и конструктом общей легкой цепи в молярном соотношении конструкта общей легкой цепи (сLC): тяжелая цепь EGFR : тяжелая цепь HER2 : тяжелая цепь HER3 = 2,5 : 2 : 1 : 1. Получено десять пулов стабильно трансфицированных клеток (А–J). Анализ ИФА антител к EGFR, к HER2 и к HER3 проводили на супернатантах 10 пулов в день 3 и день 6. Все 3 вида были обнаружены во всех пулах.

Создание стабильных клонов клеточной линии, которые совместно экспрессируют два биспецифических антитела

Пулы высевали в полутвердую среду и оставляли для выращивания на 7–10 дней. Одиночные колонии собирали и высевали в 24-луночные культуральные планшеты. Колонии повторно высевали перед сбором антител из супернатанта культур.

Определение титра антител

Титры антител к HER2 в образцах, содержащих одно биспецифическое антитело, определяли посредством ИФА в отношении белка Fc ErbB-2 (R&D systems). Титры антител к HER3 в образцах, содержащих одно биспецифическое антитело, определяли посредством ИФА в отношении человеческого белка Fc ErbB-3 (R&D systems). Титры антител к EGFR в образцах, содержащих одно биспецифическое антитело, определяли посредством ИФА в отношении человеческого белка Fc EGFR ECD (R&D systems). Для покрытия лунок планшета для ИФА использовали последовательные 2-кратные разведения антигенов, начиная с концентрации 5 мкг/мл.

Анализ ИФА для количественного определения биспецифических антител к EGFR x HER2 и EGFR x HER3 в композициях, содержащих смеси двух биспецифических антител, выполняли путем покрытия планшетов для ИФА EGFR-Fc (R&D systems). После промывки планшеты инкубировали с образцом. После промывки присутствие связанного биспецифического антитела с одним плечом EGFR и одним плечом HER2 обнаруживали путем инкубации с меченым HER2-Fc. Присутствие связанного биспецифического антитела с одним плечом EGFR и одним плечом HER3 обнаруживали путем инкубации с меченым HER3-Fc.

Очистка IgG

Очистку IgG выполняли с помощью аффинной хроматографии. Очистки проводили в стерильных условиях с применением вакуумной фильтрации. Сначала pH среды доводили до 8,0, а затем продукты инкубировали с гранулами сефарозы CL-4B, связанными с белком А (50% об./об.) (Pierce), в течение 2 часов при 25 °С на шейкере при 600 об/мин. Затем гранулы собирали вакуумным фильтрованием. Гранулы дважды промывали PBS с pH 7,4. IgG элюировали при pH 3,0 с использованием 0,1 М цитратного буфера, а фракцию IgG сразу же нейтрализовали с помощью трис-буфера с pH 8,0. Замену буфера выполняли путем центрифугирования, используя планшеты Ultracel (Millipore). Образцы помещали в конечный буферный раствор, представляющий собой PBS с pH 7,4.

Катионообменная хроматография (CIEХ)

Хроматографию CIEХ-ВЭЖХ проводили с использованием ионообменных колонок серии TSKgel SP-STAT (размер частиц 7 мкм, вн. диам. 4,6 мм x 10 см (дл.), Tosoh 21964). Колонки заполняют непористыми частицами смолы для скоростного анализа высокого разрешения, а также выделения биомолекул. Частицы в колонках TSKgel STAT содержат сеть с открытым доступом многослойных ионообменных групп для увеличения грузочной способности, а размер частиц позволяет использовать эти колонки для систем ВЭЖХ и FPLC.

TSKgel SP-STAT (размер частиц 7 мкм, вн. диам. 4,6 мм x 10 см (дл.), Tosoh 21964) уравнивают с использованием буфера А (натрий-фосфатный буфер, 25 мМ, pH 6,0), после чего антитела вытесняют из колонки путем повышения концентрации соли и создания градиента буфера В (25 мМ фосфата натрия, 1 мМ NaCl, pH 6,0). Скорость потока устанавливали равной 0,5 мл/мин. Масса всех вводимых исследуемых образцов и контролей (в PBS) составляла 10 мкг, а вводимые объемы составляли 10–100 мкл. Хроматограммы анализировали в отношении структуры пиков, значений времени удерживания и площадей основных пиков, наблюдаемых на основании результатов оценки при 220 нм.

Результаты

Сравнивали профили CIEХ биспецифических антител PB4516p08 и PB6892p04 (см. Фиг. 2). Отмечено, что продукт PB6892 содержал значительное количество примесей. Кроме того, время удерживания фракции биспецифического антитела PB6892 было существенно меньше времени удерживания фракции биспецифического

антитела PB4516. Для совместного получения одной и той же клеткой и последующей совместной очистки с использованием CIEX значения времени удерживания двух биспецифических антител предпочтительно находятся ближе друг к другу. По этой причине переменная область плеча HER2 для PB6892 была заменена другой

5 переменной областью. Отбирали тяжелую цепь с переменной областью MF2032 и использовали для получения биспецифического антитела PB11244 к EGFR x HER2. Профили CIEX PB4516p10 и PB11244p01 показаны на Фиг. 3. Значения времени удерживания фракций биспецифического антитела составляют соответственно 16,310 и 16,950. Эти значения времени удерживания в достаточной мере схожи, чтобы обеспечить

10 возможность совместной очистки с использованием CIEX в указанных условиях. Кроме того, на фигуре показано, что значения времени удерживания примесей достаточно различаются, чтобы обеспечивать возможность эффективного разделения в аналитической и препаративной колонках. Описанные выше препараты биспецифических антител были получены в клетках HEK293.

15 Для совместного получения использовали клетки CHO-K1. Клетки CHO трансфицировали конструктами, содержащими три тяжелые цепи с соответствующими переменными областями MF3755 (EGFR), M2032 (HER2) и MF3178 (HER3), трансфицировали в клетки CHO-K1 вместе с конструктом, экспрессирующим

20 переменную область легкой цепи с SEQ ID: NO: 26. Вектор-положительные клетки отбирали и объединяли. Получено десять отдельных пулов трансфицированных клеток CHO-K1 (обозначаемых A–J).

В таблице 1 показаны количества биспецифического антитела PB4516 (EGFR x HER3) и

25 PB11244 (EGFR x HER2), продуцируемого соответствующими пулами. Кроме того, показано соотношение количеств и общее количество продуцируемого IgG. Пулы F и J выбирали для субклонирования.

В таблице 2 показано количество биспецифического антитела PB4516 (EGFR x HER3) и

30 PB11244 (EGFR x HER2), продуцируемого соответствующими клонами.

Антитело, продуцируемое клоном FST2cp12, использовали для анализа профиля CIEX (см. Фиг. 4). Очевидно, что два биспецифических антитела эффективно совместно элюируются в тех же фракциях элюирования CIEX.

Клон FST2ср09 дополнительно субклонировали, чтобы убедиться, что клеточная линия была клональной, и в полученных антителах дополнительно определяли профиль CIEХ. На Фиг. 5 представлен профиль CIEХ. Очевидно, что два биспецифических антитела эффективно совместно элюируются в тех же фракциях элюирования CIEХ.

- 5 Относительный вклад двух биспецифических антител в совместное элюирование анализировали с помощью твердофазного ИФА и/или колонок гидрофобных взаимодействий. Специфический для биспецифического антитела ИФА указывал на присутствие 743 мкг/мл биспецифического антитела PB11244 к EGFR/HER2 и 1134 мкг/мл биспецифического антитела PB4516 к EGFR/HER3.

10

Пример 2

Создание стабильных пулов клеточной линии, которые совместно экспрессируют два биспецифических антитела

- 15 Клеточные линии, экспрессирующие два на два биспецифических антитела, перечисленных на Фиг. 7, получают следующим образом. Клетки СНО трансфицируют тремя конструктами тяжелой цепи и конструктом общей легкой цепи. Три тяжелые цепи идентифицируют переменными областями тяжелой цепи (MFXXXX), указанными в блоке. Легкая цепь содержит последовательность переменной области легкой
- 20 цепи IgVk1*39/jk1 SEQ ID NO: 26. Два биспецифических антитела имеют одну общую тяжелую цепь и по одной отличающейся тяжелой цепи. Например, первая пара, приведенная на Фиг. 7, имеет общую тяжелую цепь, содержащую одинаковое связывающееся с HER3 плечо, содержащее переменную область тяжелой
- 25 связывающееся с EGFR плечо с переменной областью тяжелой цепи (MF4003), а PB4188 имеет связывающееся с HER2 плечо с переменной областью тяжелой цепи (MF3958). Общая тяжелая цепь имеет область КК СН3 совместимого домена гетеродимеризации DE/КК. Общее плечо тяжелой цепи может также иметь область DE
- 30 СН3. Например, на Фиг. 3–5 два биспецифических антитела представляют собой совместно очищенные PB11244 и PB4516. Как показано на Фиг. 3с, PB11244 и PB4516 имеют одно и то же связывающееся с EGFR плечо с переменной областью тяжелой
- 35 цепи (MF3755), а PB11244 имеет связывающееся с HER2 плечо с переменной областью тяжелой цепи (MF2032), а PB4516 имеет связывающееся с HER3 плечо с переменной областью тяжелой цепи (MF3178). Общее плечо тяжелой цепи в этой паре биспецифических антител имеет область DE СН3, тогда как различающиеся связывающиеся с HER2 и HER3 плечи имеют область КК СН3.

Молярное отношение конструктора общей легкой цепи (сLC) : к конструктору общей тяжелой цепи : к конструктору 1 отличающейся тяжелой цепи : конструктору 2 отличающейся тяжелой цепи = 2,5 : 2 : 1 : 1. Получают пулы стабильно трансфицированных клеток.

Анализ антигенов посредством анализа ИФА выполняют на супернатантах, собранных из пулов. В пулах обнаруживают все 3 антигенсвязывающих вида. Значения времени удерживания биспецифических антител при СІЕХ в каждой паре, изображенной на Фиг. 7, определяют в аналогичных условиях СІЕХ; они указаны в столбце 8.

Отклонение от среднего времени удерживания рассчитывают по формуле $100 \times ((A - B) / (A + B))$, где А представляет собой время удерживания биспецифического антитела с наибольшим временем удерживания. Например, отклонение для первой пары составляет $100 \times ((16,46 - 16,24) / (16,46 + 16,24)) = 0,67$ или 0,7%.

Антитела в собранных супернатантах сначала отделяют от других белков в супернатанте путем экстракции белком А с последующим элюированием кислотой и быстрой нейтрализацией. Впоследствии буфер собранных антител заменяют PBS. Затем образцы загружают в колонки СІЕХ, промывают и элюируют путем создания возрастающего градиента соли. Абсорбцию элюата измеряют при 220 нм, а значения времени удерживания рассчитывают от начала градиента соли и наблюдения за пиком (-ами) биспецифических антител. Биспецифические антитела собирают и проверяют соответствующие биспецифические антитела в собранном элюате посредством ИФА. Значения времени удерживания соответствующих биспецифических антител указаны в последнем столбце. Очевидно, что значения времени удерживания многих пар обеспечивают их эффективное совместное элюирование в колонке СІЕХ. Кроме того, очевидно, что хроматография СІЕХ обеспечивает хорошее разделение совместно элюируемых биспецифических антител и соответствующих гомодимеров (при наличии). На Фиг. 6 показаны значения времени удерживания различных антител с гомодимерами тяжелых цепей, содержащими переменные области тяжелой цепи, присутствующие в совместно элюируемых биспецифических антителах. Очевидно, что время удерживания гомодимеров в достаточной степени отличается от значений времени удерживания соответствующих биспецифических антител. Например, в первом блоке на Фиг. 7 гомодимеры PG3178, PG3958 и PG4003 могут присутствовать в продукте. Значения времени удерживания соответствующих гомодимеров составляют приблизительно 22, 12 и 13 (Фиг. 6, строки 1–3), тогда как значения времени удерживания биспецифических антител, содержащих переменные области тяжелой цепи, составляют приблизительно 19 и 19,5 (Фиг. 7, строки 1 и 2).

Таблица 1

Пул	Конц. α -EGFR x α -HER2 (мкг/мл)	Конц. α -EGFR x α -HER3 (мкг/мл)	Соотношение (α -EGFR x α -HER2 : α -EGFR x α -HER3)	Общее количество IgG (мкг/мл)
A	153,6	162,0	1 : 1,1	315,6
B	120,1	336,3	1 : 2,8	456,3
C	325,5	741,6	1 : 2,3	1067,1
D	510,6	856,8	1 : 1,7	1367,4
E	273,0	526,5	1 : 1,9	799,6
F	1824,7	1024,9	1 : 0,6	2849,6
G	704,2	849,8	1 : 1,2	1554,0
H	951,1	467,5	1 : 0,5	1418,6
I	450,7	691,0	1 : 1,5	1141,7
J	1288,9	1572,1	1 : 1,2	2861,0

- Таблица 1. Количественное определение продукции биспецифических антител к EGFRxHER2 и EGFRxHER3 в пулах клеток. Оценивали супернатанты культур из десяти пулов (A–J). Анализы ИФА были основаны на покрытии EGFR-Fc, связывании полученного антитела и обнаружении либо с меченым HER2-Fc, либо с меченым HER3-Fc. Пулы A–J анализировали с использованием двух анализов ИФА. Биспецифические антитела PB4516 и PB11244 представляют собой антитела, содержащие тяжелую цепь IgG1 и совместимые домены гетеродимеризации DE/КК. Тяжелые цепи объединяют с общей легкой цепью. Биспецифические антитела имеют общую переменную область тяжелой цепи MF3755 на одной тяжелой цепи, и каждое из них имеет отличающуюся переменную область тяжелой цепи на другой тяжелой цепи IgG1, MF3178 для PB4516 и MF2032 для PB11244.

Таблица 2

№	HER2 [мкг/мл]	HER3 [мкг/мл]	HER2/HER3
FST1cp02	48,7	1449,2	0,03
FST1cp03	103,4	488,9	0,21
FST1cp04	131,4	1675,0	0,08
FST1cp14	259,1	214,6	1,21
FST1cp24	372,3	817,0	0,46
FST1cp26	92,2	706,7	0,13
FST2cp09	1026,2	1509,0	0,68
FST2cp12	725,7	1334,2	0,54
FST2cp13	737,4	1173,0	0,63
FST2cp20	617,6	1759,3	0,35
FST2cp21	993,0	1852,3	0,54
FST2cp23	937,4	1095,5	0,86
JST1cp01	121,3	490,6	0,25
JST1cp04	239,8	383,7	0,62
JST1cp05	187,2	759,0	0,25
JST1cp09	828,6	718,5	1,15
JST1cp13	103,5	175,8	0,59
JST1cp24	481,5	423,7	1,14

Таблица 2. Отобранные пулы использовали для клонирования одиночных клеток. Из трех пулов отбирали 18 колоний. Для клонирования одиночных клеток использовали два независимых пула F (FST1 и FST2) и один пул J (JST1). Символы ср с последующим номером обозначают отдельные колонии пула. Собранные колонии выращивали и использовали для сбора антител. Отдельные колонии из одних и тех же пулов производили различные количества и различные пропорции соответствующих биспецифических антител.

1. Способ получения по меньшей мере двух антител, включающий
 - обеспечение клеток нуклеиновой кислотой, кодирующей антитела;
 - 5 - культивирование указанных клеток;
 - сбор антител из культуры; и
 - отделение полученных антител от полуантител с помощью ионообменной хроматографии (ИЕХ);

причем способ характеризуется тем, что антитела демонстрируют значения времени

10 удерживания при ИЕХ, которые отклоняются на 10% или менее от среднего значений времени удерживания отдельных антител в используемых условиях ИЕХ.
2. Способ по п. 1, в котором сбор антител из культуры включает очистку антитела от других белков путем аффинной очистки антител, предпочтительно путем экстракции
- 15 белком А.
3. Способ по п. 2, дополнительно включающий выполнение эксклюзионной хроматографии (гель-фильтрационной хроматографии и/или анионообменной хроматографии) на очищенных путем аффинной очистки антителах.
- 20 4. Способ по пп. 1–3, в котором после ИЕХ собранные антитела количественно анализируют на относительные уровни экспрессии с помощью гидрофобной хроматографии (ННС).
- 25 5. Способ по п. 4, в котором специфичность собранных антител проверяют с помощью ИФА.
6. Способ по пп. 1–5, в котором значения времени удерживания соответствующих полуантител находятся за пределами диапазона, охватываемого значениями времени
- 30 удерживания антител.
7. Способ по п. 6, в котором клетки продуцируют 3 тяжелых цепи.
8. Способ по п. 7, в котором указанные тяжелые цепи содержат домены для
- 35 эффективной гетеродимеризации тяжелых цепей.

9. Способ по пп. 1–8, в котором по меньшей мере два из указанных антител представляют собой биспецифические антитела.
10. Способ по пп. 1–9, в котором по меньшей мере два из указанных антител имеют идентичную тяжелую цепь.
11. Способ по пп. 1–10, в котором указанные антитела имеют изоэлектрические точки (pI), которые отличаются на 0,4 единицы или менее от среднего значения pI указанных по меньшей мере двух антител.
12. Способ по пп. 1–11, в котором антитела отбирают по наличию комбинаций тяжелой и легкой цепей, значения времени удерживания которых существенно отличаются от значений времени удерживания полных антител в используемых условиях ИЕХ.
13. Способ по п. 12, в котором pI комбинаций тяжелой и легкой цепей отличается на более чем 0,4 единицы от среднего pI указанных по меньшей мере двух антител.
14. Способ по пп. 1–13, в котором тяжелые цепи содержат домен CH3, который способствует гетеродимеризации тяжелых цепей.
15. Способ по пп. 1–14, в котором тяжелые цепи указанных антител представляют собой тяжелые цепи IgG.
16. Способ по пп. 7–15, в котором одна тяжелая цепь содержит аминокислотные замены L351K и T366K (нумерация ЕС) в области CH3, а другая тяжелая цепь содержит аминокислотные замены L351D и L368E в области CH3.
17. Способ получения по меньшей мере двух антител, включающий
 - обеспечение клеток нуклеиновой кислотой, кодирующей антитела;
 - культивирование указанных клеток;
 - сбор антител из культуры; и
 - отделение полученных антител от полуантител с помощью ионообменной хроматографии (ИЕХ);
 причем способ характеризуется тем, что антитела демонстрируют значения времени удерживания при ИЕХ, отклоняющиеся на 10% или менее от среднего значений времени

удерживания отдельных антител в используемых условиях ИЕХ, и при этом после ИЕХ собранные антитела количественно анализируют на относительные уровни экспрессии с помощью гидрофобной хроматографии (ННС) и проверяют специфичность собранных антител посредством ИФА.

5

18. Композиция, содержащая 2–10 рекомбинантных антител, получаемых способом по пп. 1–17.

10

19. Композиция, содержащая 2–10 рекомбинантных антител, отличающаяся тем, что значения времени удерживания при ИЕХ по меньшей мере двух из указанных антител отличаются на 10% или менее от среднего значений времени удерживания отдельных антител в условиях ИЕХ.

15

20. Композиция, содержащая 2–10 рекомбинантных антител, отличающаяся тем, что рI по меньшей мере двух из указанных антител отличаются на 0,4 единицы или менее от средней рI указанных по меньшей мере двух антител.

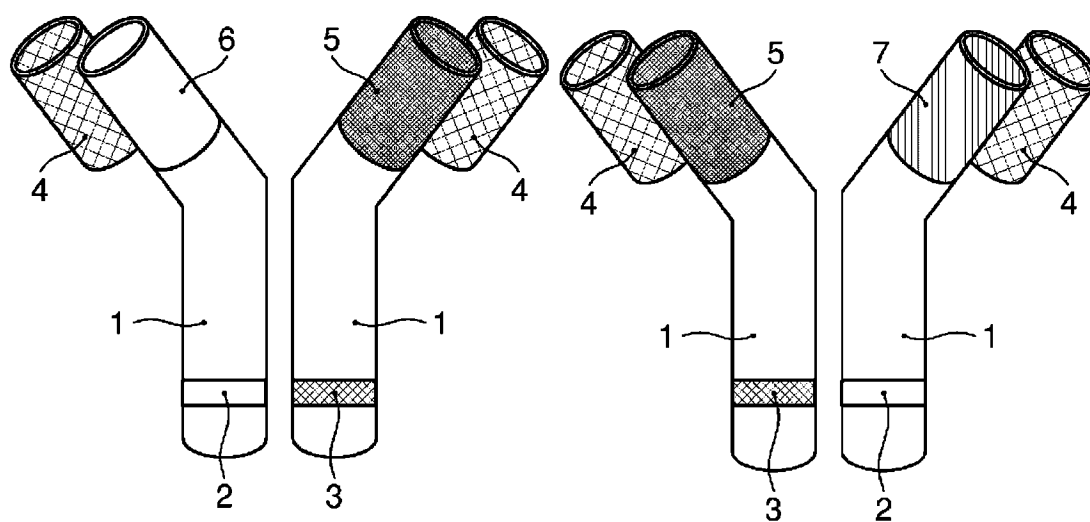
20

21. Композиция по пп. 18–20, отличающаяся тем, что значения времени удерживания при ИЕХ и/или рI являются по существу одинаковыми для всех антител.

22. Композиция по пп. 18–21, в которой по меньшей мере два из антител являются биспецифическими антителами.

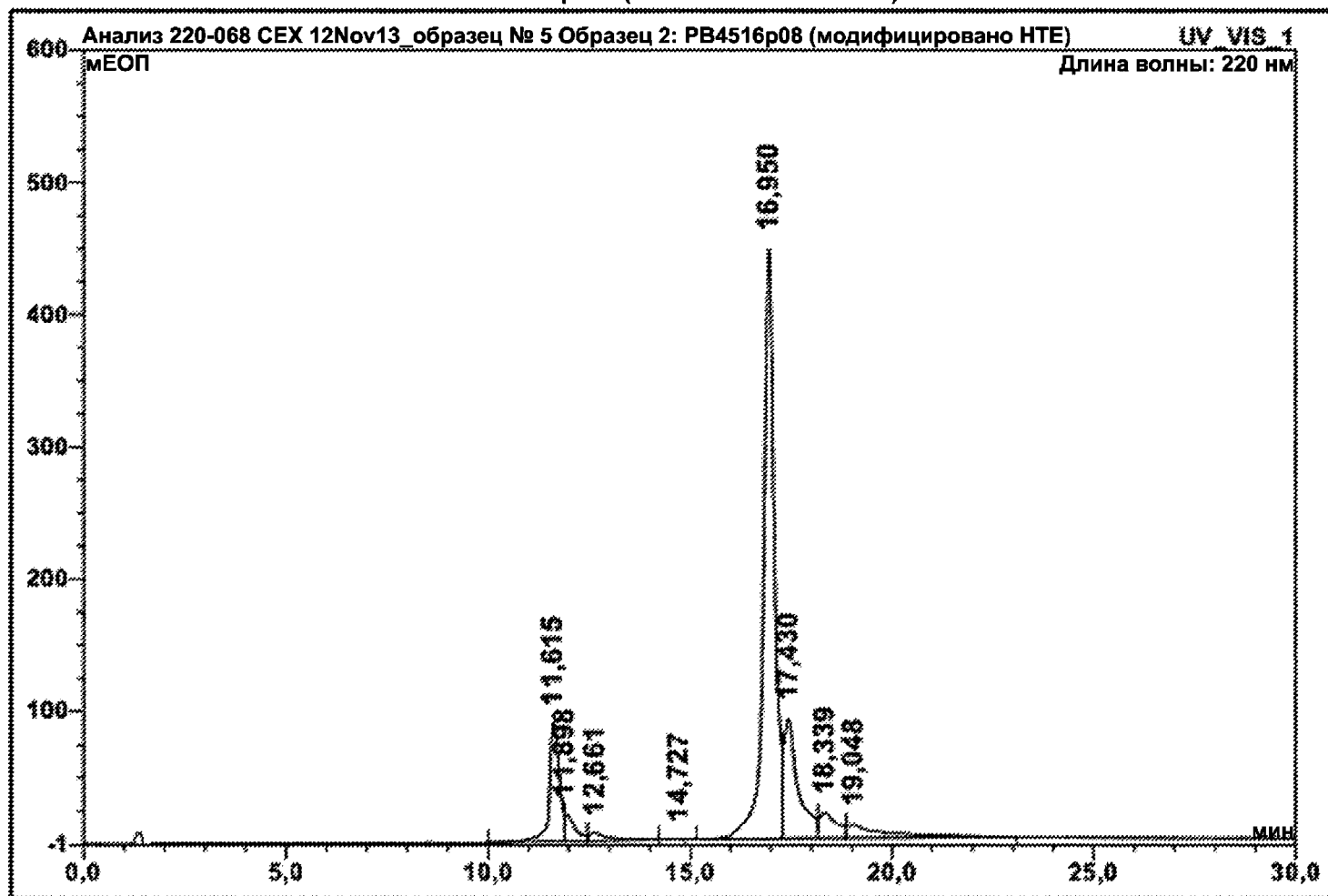
25

23. Композиция по п. 22, в которой по меньшей мере два из указанных антител имеют идентичную тяжелую цепь.

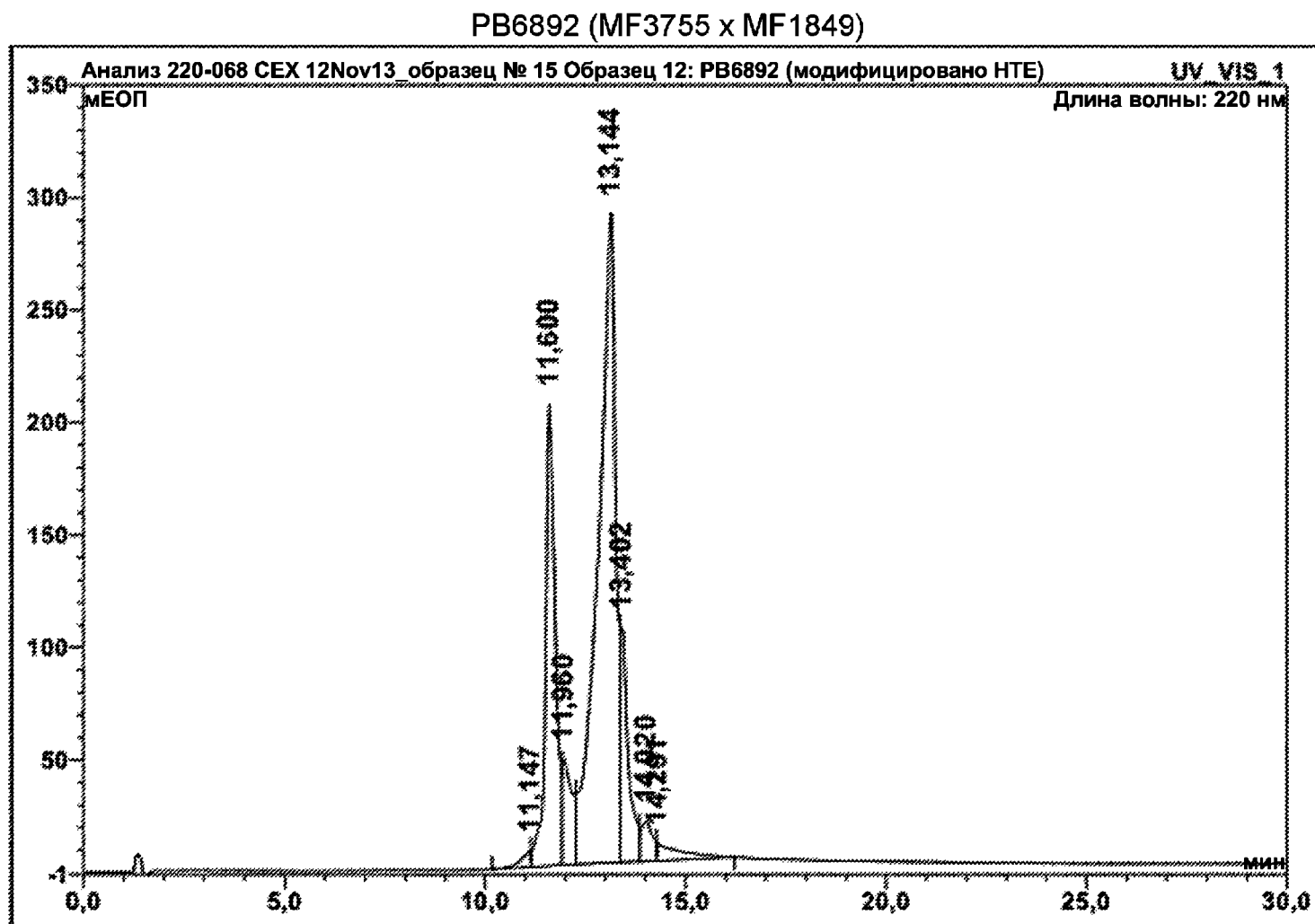


Фиг. 1

PB4516p08 (MF3755 x MF3178)

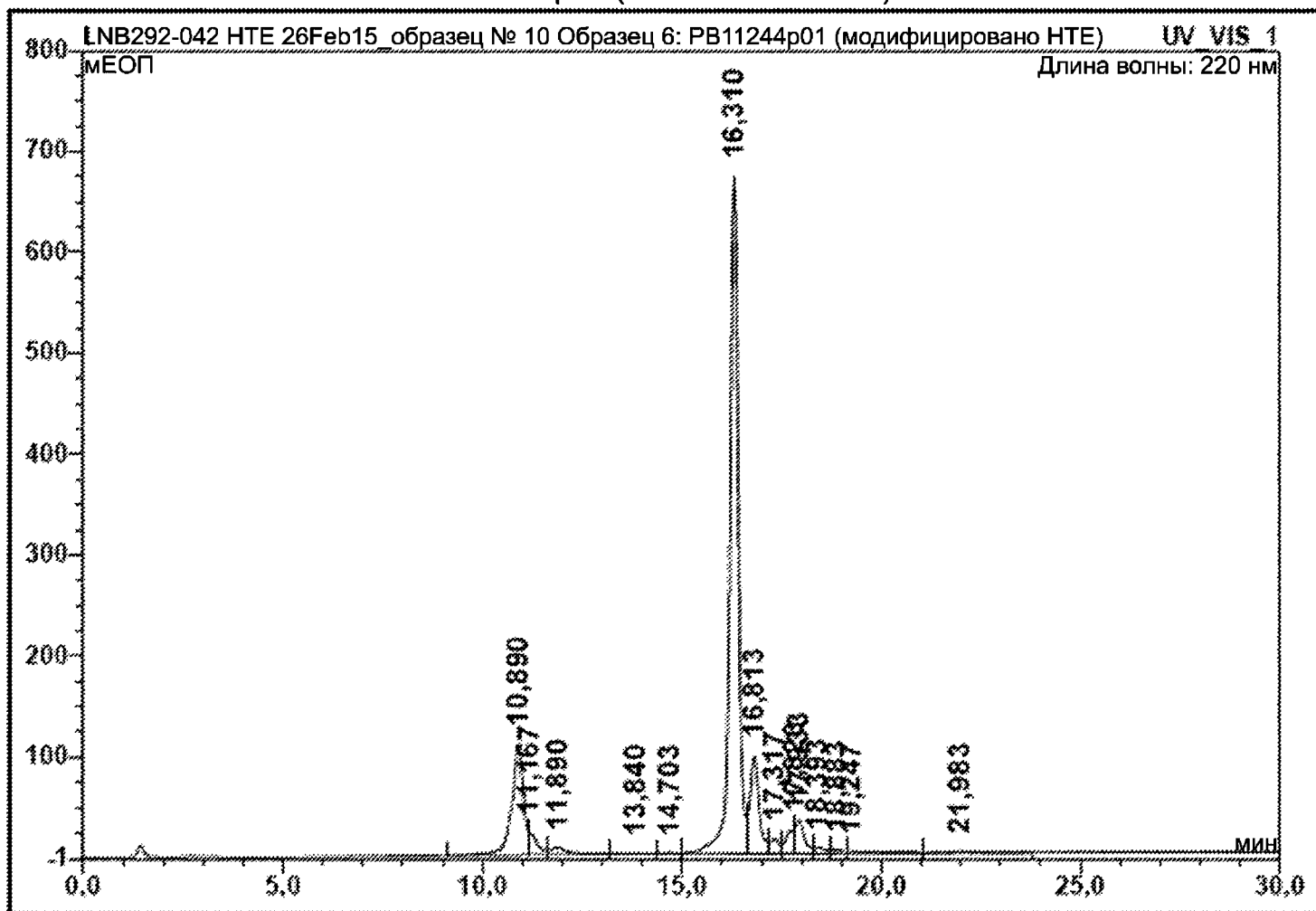


Фиг. 2А

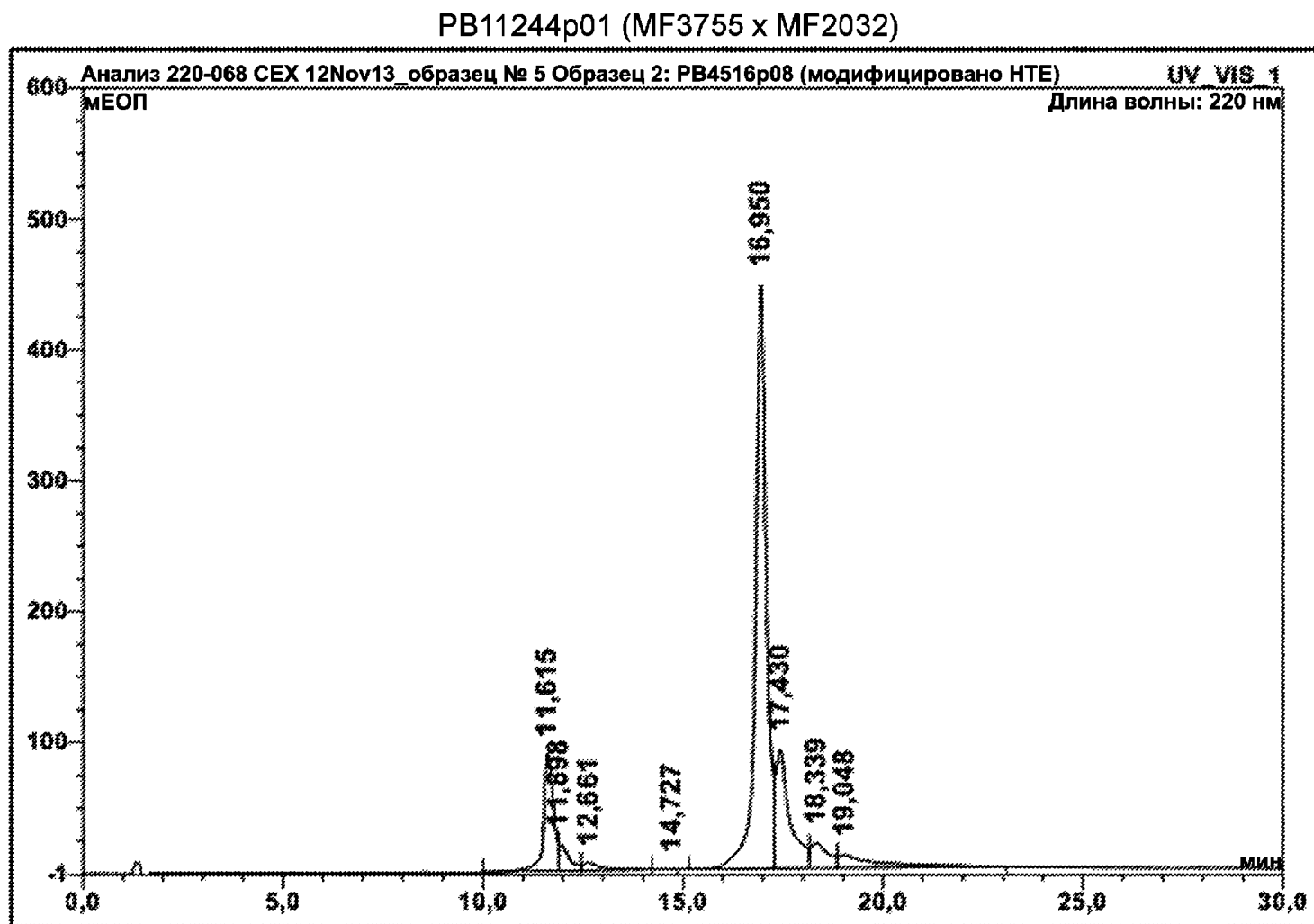


Фиг. 2В

PB4516p10 (MF3755 x MF3178)



Фиг. 3А

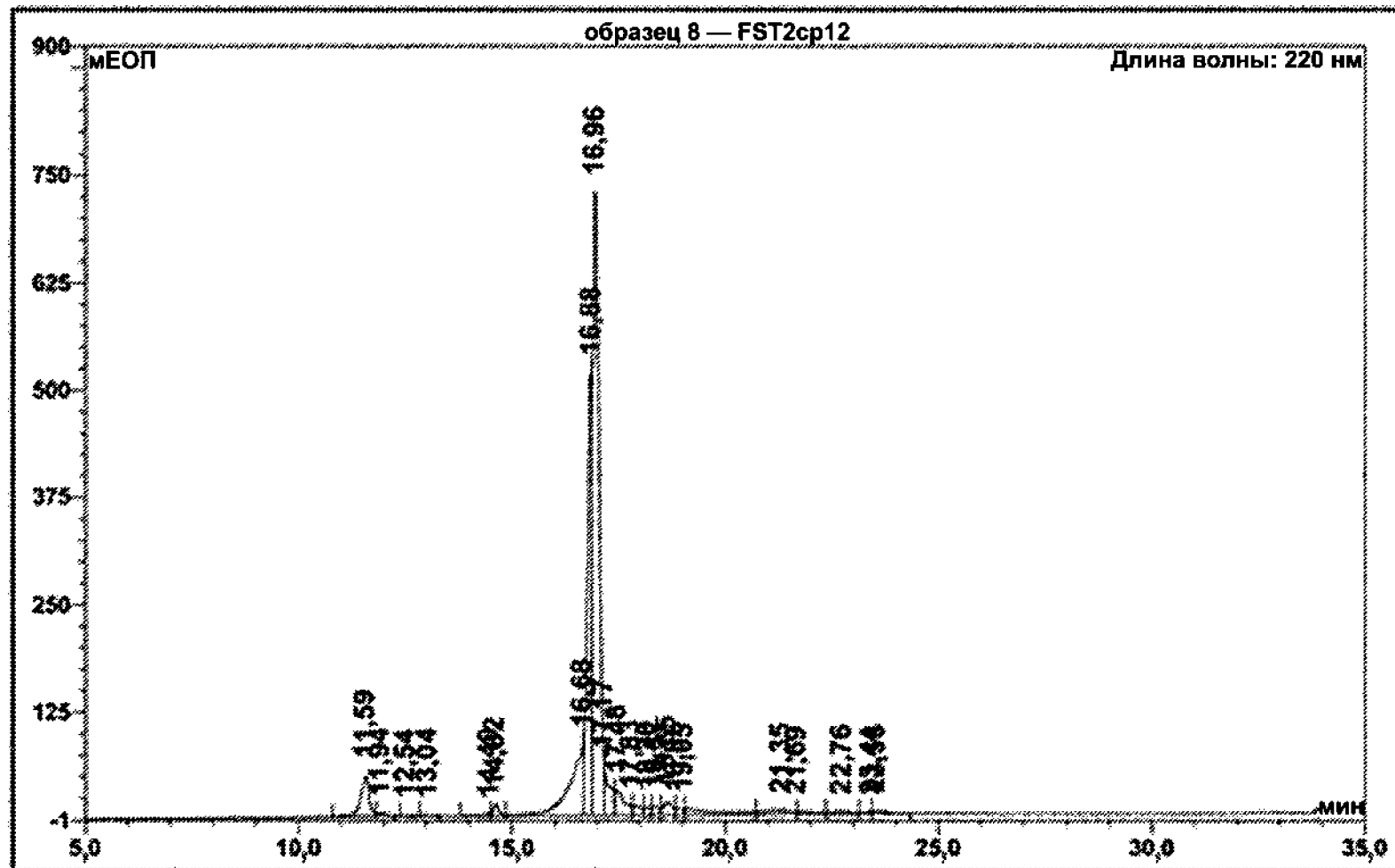


Фиг. 3В

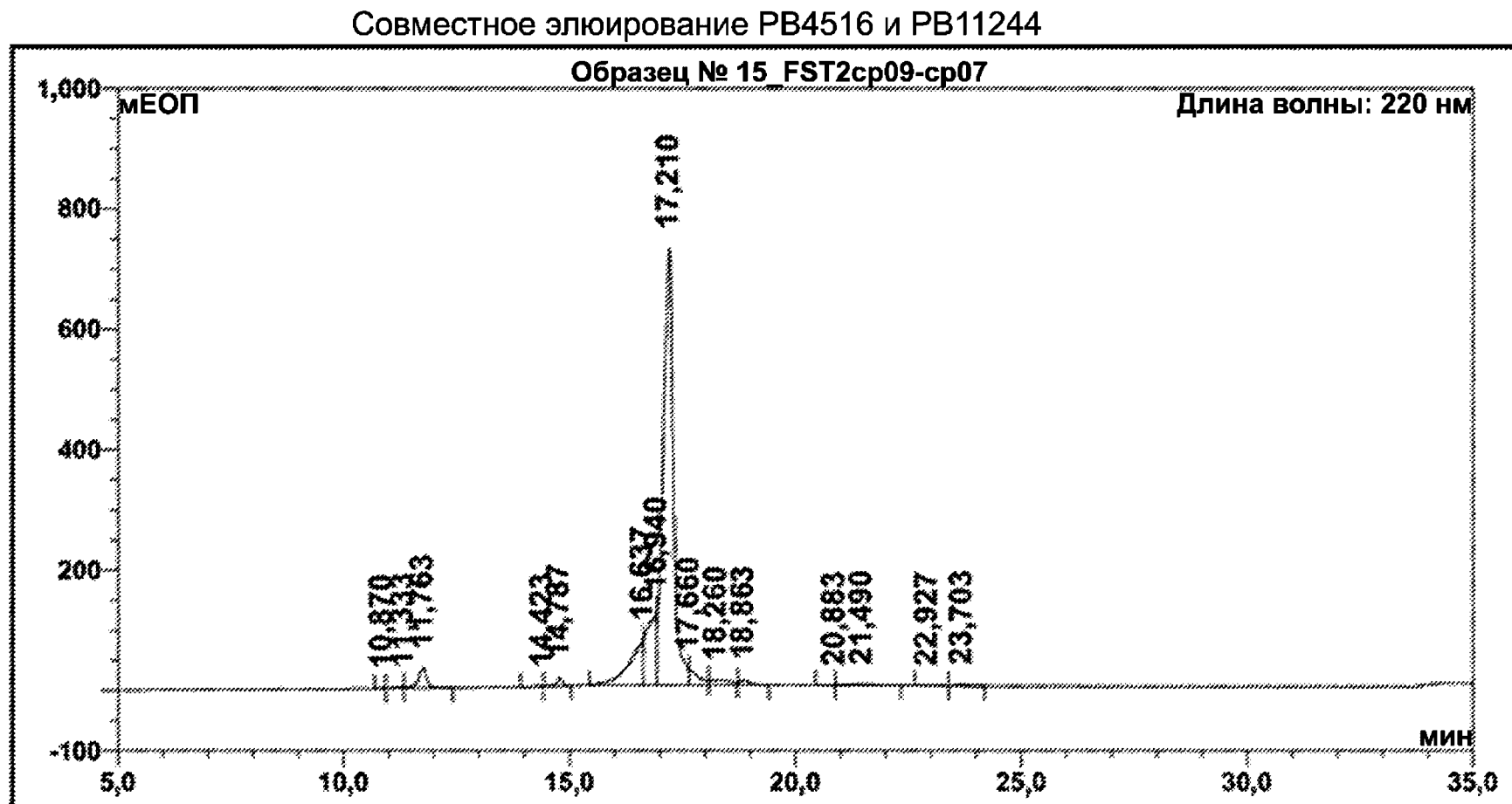
РВ	Мишень 1	VH pI	Мишень 2	VH pI	Среднее значение VH pI T1, T2	Различие в pI VH между парами
PB11244	EGFR – MF3755-DE	6,09	HER2 – MF2032-KK	9,33	7,71	0,08
PB4516	EGFR – MF3755-DE	6,09	HER3 – MF3178-KK	9,17	7,63	

Фиг. 3С

Совместное элюирование РВ4516 и РВ11244



Фиг. 4



Фиг. 5

MF	PG	Время удерживания
MF3178	PG3178	22,282
MF3958	PG3958	12,208
MF4003	PG4003	12,983
MF3163	PG3163	21,706
MF6061	PG6061	24,000
MF6930	PG6930	12,393
MF6256	PG6256	10,333
MF3755	PG3755	11,123
MF1898	PG1898	17,125
MF2032	PG2032	21,760

Фиг. 6

PВ	Мишень 1	VH pI	Мишень 2	VH pI	Среднее значение VH pI T1, T2	Общее значение pI всех PВ	Различие в pI VH между парамн	Различие в pI всех PВ	Время удерживания
PВ4188	HER3 – MF3178-KK	9,17	HER2 – MF3958-DE	8,55	8,66	8,52	0,035	0,01	18,99
PВ4528	HER3 – MF3178-KK	9,17	EGFR – MF4003-DE	8,62	8,895	8,53			19,53
PВ4522	HER3 – MF3178-KK	9,17	EGFR – MF4280-DE	4,73	6,95	8,07	0,08	0,09	16,24
PВ11003	HER3 – MF6061-KK	9,33	EGFR – MF4280-DE	4,73	7,03	8,16			16,48
PВ14120	PD1 – MF6930-KK	6,54	TIM3 – MF6501-DE	5,21	5,875	8,07	0,01	0	11,37
PВ14126	PD1 – MF6256-KK	6,32	TIM3 – MF6501-DE	5,21	5,865	8,07			11,4
PВ6892	HER2 – MF1849-KK	8,55	EGFR – MF3755-DE	6,09	7,32	8,24	0,045	0	13,21
PВ14063	LGR5 – MF7423-KK	8,64	EGFR – MF3755-DE	6,09	7,365	8,24			13,48
PВ11243	EGFR – MF3755-DE	6,09	HER2 – MF1898-KK	9,2	7,645	8,37	0,625	0,21	13,9
PВ14068	LGR5 – MF7428-KK	7,95	EGFR – MF3755-DE	6,09	7,0	8,16			13,98
PВ11246	EGFR – MF3755-DE	6,09	HER2 – MF1898-KK	9,2	7,645	8,37	0,28	0,13	13,9
PВ14063	LGR5 – MF7423-KK	8,64	EGFR – MF3755-DE	6,09	7,365	8,24			14,12
PВ14325	LGR5 – MF7533-KK	9,01	EGFR – MF3755-DE	6,09	7,55	8,31	0,16	0,12	16,22
PВ11244	EGFR – MF3755-DE	6,09	HER2 – MF2032-KK	9,33	7,71	8,43			16,31
PВ6892	HER2 – MF1849-KK	8,55	EGFR – MF3755-DE	6,09	7,32	8,24	0,3	0,06	13,21
PВ14068	LGR5 – MF7428-KK	7,95	EGFR – MF3755-DE	6,09	7,02	8,16			13,21

Фиг. 7

Фиг. 8

Аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой цепи различных переменных доменов, обозначенных MF-номером SEQ ID NO: 1–21, и CDR и переменных областей легкой цепи с SEQ ID NO: 22–27.

ВЫНОСКИ ИЗ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

1	HER3-MF3178	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPN SGGTNYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCARDHGRHFWSY WGFDYWGQGLTVTVSS
2	HER3-MF3163	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPN SGGTNYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCAKDSYSRHFYSW WAFDYWGQGLTVTVSS
3	HER3-MF6061	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPQ SGGTNYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCARDHGRHFWSY WGFDYWGQGLTVTVSS
4	PD1-MF6930	EVQLVQSGAEVKKPGSSMKVSKASGGTFSSNYVISWVRQAPGQGLEWMGMIIPIV FETATYEKKFQGRVTIIADKSTSTVYMESSLRSEDAAVYYCARGTVEATLLFD YWGQGLTVTVSS
5	PD1-MF6256	EVQLVQSGAEVKKPGSSMKVSKASGGTFSSYVISWVRQAPGQGLEWMGMIIPIV FDTSSYEKKFQGRVTIIADKSTSTVYLESSLRSEDAAVYYCARGTVEATLLFD FWGQGLTVTVSS
6	HER2-MF1849	QVQLVESGGGVVQPGSRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD GSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRRAEDTAVYYCAKGDYGSYSSYA FDYWGQGLTVTVSS
7	LGR5-MF7423	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSNYAISWVRQAPGQGLEWMGSIPIPI LGTTHAQKFQDRVTITAGKSSNTAYMDLSSLRSDDTAVYYCAREERIAARLDYF DSWGQGLTVTVSS
8	EGFR-MF3755	QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYDFTNYAMNWVRQAPGHGLEWMGWINAN TGDPTYAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDSAVYYCTRERFLEWLHFD YWGQGLTVTVSS
9	LGR5-MF7428	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSNYAISWVRQAPGQGLEWMGSIPIPI LGTTHAQKFQDRVTITADKSSKTTYMELNSLRSDDTAVYYCARELIAARLDYF DSWGQGLTVTVSS
10	LGR5-MF7533	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSNYAISWVRQAPGQGLEWMGSIPIPI LGTTHAQKFQDRVTITAGKSSNTAYMDLSSLRSDDTAVYYCAREERIAARLDYF DSWGRGLTVTVSS
11	LGR5-MF7532	EVQLVQSGSKLKKPGASVKVSKASGYTFTSYTMNWVRQAPGQGLEWMGWINTD TGDPTYAQGFTGRFVFLDTSVSTAFQLINSLKAEDTAVYYCARGDCDSTSCYR YSYGYEDYWGRTGLTVTVSS
12	EGFR-MF4280	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPE YGKTFFAQNFGGRVTMTEDTSADTAYMELSSLRSEDATVYYCATEGYETTTY YNLFDSWGQGLTVTVSS
13	HER2-MF3958	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTAYYINWVRQAPGQGLEWIGRIYPG SGYTSYAKKFQGRATLTAEDESTAYMELSSLRSEDATVYFCARPPVYYDSAWF AYWGQGLTVTVSS
14	EGFR-MF4003	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFPSFAMNWLRLQAPGQGLEWMGWITTN TGDPTYAQGFSGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARVYNWIRGFDY WGQGLTVTVSS
17	HER2-MF3025	QVQLKQSGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTGYYINWVKRQPGQGLEWIARIYPG SGYTYNEKFKGKATLTAEESNTAYMHLSSLTSEDSAVYFCARPHYGYDDWYF AVWGTTGTTVTVSS
18	EGFR-MF4010	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYFTTNAMNWVRQAPGQGLEWMGWINTI TGDPSYAQGFTGRFVFLDTSVNTAYLQISSLKAEDTAVYYCAREEFLEWLFFD YWGQGLTVTVSS

Фиг. 8 (продолжение)

19	TIM3-MF6501	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNAWDSMAF DYWGQGT LVT VSS
20	HER2-MF1898	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCLASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD GSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGFRTTSLG FDYWGQGT LVT VSS
21	HER2-MF2032	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCLASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD GSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDYYRRTARAG FDYWGQGT LVT VSS

22	VL CDR1	QSISSY
23	VL CDR2	AASSLQS
24	VL CDR3	QSYSTP
25	IgVκ1-39*01	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTP
26	Общая легкая цепь IgKV1*39/jκ1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ SYSTPPTFGQGTKEIK
27	Общая легкая цепь IgKV1*39/jκ5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ SYSTPPTFGQGTKEIK
28	IgG1 CH1 Шарнир	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCP
29	IgG1 CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLVHQLDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AK
30	IgG1 CH3 KK	GQPREPQVYTTTPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
31	IgG1 CH3 DE	GQPREPQVYTTTPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK