

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290610** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.09

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

(22) Дата подачи заявки
2020.09.28

(54) ГЕТЕРОДИМЕРНЫЕ БЕЛКИ

(31) **62/906,918**

(32) **2019.09.27**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/053114**

(87) **WO 2021/062382 2021.04.01**

(71) Заявитель:
АГЕНУС ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

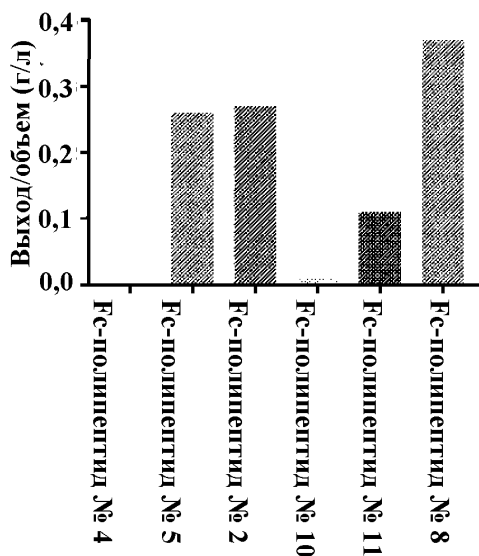
**Чанд Дхан Сидхартха, Джавад Захра,
Илков Вероника Франциска (US)**

(74) Представитель:

**Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,
Прищепный С.В., Гизатуллина Е.М.,
Строкова О.В., Костюшенкова М.Ю.,
Гизатуллин Ш.Ф., Пармонова К.В.
(RU)**

(57) В данном документе представлены гетеродимерные белки (например, мультиспецифические антитела), которые демонстрируют повышенное связывание с человеческим Fc-гамма-рецептором IIIA (FcγRIIIA) по сравнению со встречающимися в природе антителами и обладают надлежащей технологичностью получения. Такие гетеродимерные белки особенно применимы в качестве мультиспецифических связывающих белков (например, мультиспецифических антител). Также представлены фармацевтические композиции, содержащие эти гетеродимерные белки, нуклеиновые кислоты, кодирующие эти гетеродимерные белки, а также векторы экспрессии и клетки-хозяева для получения этих гетеродимерных белков.

Уровни экспрессии Fc-полипептида



202290610 A1

202290610

A1

ГЕТЕРОДИМЕРНЫЕ БЕЛКИ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Для настоящей заявки испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на патент США № 62/906918, поданной 27 сентября 2019 года, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

1. ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Настоящее изобретение относится к гетеродимерным белкам (например, мультиспецифическим антителам) и способам их получения.

2. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Мультиспецифические связывающие молекулы (например, мультиспецифические антитела), обладающие двумя или более специфичностями связывания, имеют большие перспективы в качестве терапевтических средств ввиду способности этих молекул модулировать активность множества мишеней *in vivo*. Одним из распространенных способов получения мультиспецифических антител является гетеродимеризация тяжелых цепей двух разных антител. Для содействия такой гетеродимеризации домены СН3 двух антител конструируют таким образом, чтобы они содержали комплементарные наборы мутаций, которые приводят к преимуществу в гетеродимеризации тяжелых цепей по сравнению с гомодимеризацией (см., например, публикацию Ridgway J.B. et al., 1996, Protein Eng., 9:617-621 и патент США № 9409989, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[0004] В определенных случаях требуется усилить связывание Fc-области мультиспецифического антитела с человеческим Fc-гамма-рецептором IIIA (FcγRIIIA) по сравнению со связывающей способностью Fc-области соответствующего встречающегося в природе антитела. Одним из способов обеспечения такого усиленного связывания с FcγRIIIA является конструирование Fc-области мультиспецифического антитела, которая содержит специфические мутации аминокислот в положениях аминокислот 239, 330 и 332 Fc-области в соответствии с EU-индексом (см., например, Lazar, G.A. et al., 2006, PNAS, 103(11):4005-4010).

Однако заявитель выявил, что сочетание этих мутаций в Fc с усиливающими гетеродимеризацию мутациями в Fc в положениях аминокислот 366, 368 и 407 согласно EU-индексу может оказывать отрицательное влияние на технологичность получения мультиспецифических антител, содержащих эти мутации.

[0005] Соответственно, в данной области техники существует потребность в улучшенных мультиспецифических антителах, которые проявляют усиленное связывание с FcγRIIIA, с сохранением при этом их надлежащей технологичности получения.

3. СУТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] В настоящем изобретении представлены гетеродимерные белки (например, мультиспецифические антитела), которые проявляют усиленное связывание с FcγRIIIA по сравнению с соответствующим встречающимся в природе антителом и обладают надлежащей технологичностью производства. Гетеродимерные белки обычно содержат первый Fc-полипептид, содержащий аспартат, глутамат и триптофан в положениях аминокислот 239, 332 и 366 соответственно; и второй Fc-полипептид, содержащий аспартат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержащий глутамат в положении аминокислоты 332, при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с EU-индексом. В определенных вариантах осуществления гетеродимерные белки содержат первый Fc-полипептид, содержащий аспартат, лейцин, глутамат и триптофан в положениях аминокислот 239, 330, 332 и 366 соответственно; и второй Fc-полипептид, содержащий аспартат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержащий лейцин и глутамат в положениях аминокислот 330 и 332 соответственно, при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с EU-индексом. Такие гетеродимерные белки особенно применимы в качестве мультиспецифических связывающих белков (например, мультиспецифических антител). Также представлены фармацевтические композиции, содержащие эти гетеродимерные белки, нуклеиновые кислоты, кодирующие эти гетеродимерные белки, а также векторы экспрессии и клетки-хозяева для получения этих гетеродимерных белков. Не вдаваясь в теорию, заявитель полагает, что второй Fc-полипептид гетеродимерных белков, раскрытых в данном

документе, характеризуется улучшенной термостабильностью по сравнению с соответствующим Fc-полипептидом, содержащим мутации в положениях аминокислот 239, 330, 332, 366, 368 и 407, пронумерованных в соответствии с EU-индексом.

[0007] Соответственно, в одном аспекте настоящего изобретения представлены гетеродимерные белки.

[0008] В определенных вариантах осуществления гетеродимерный белок содержит первый Fc-полипептид и второй Fc-полипептид, где первый Fc-полипептид содержит аспартат, глутамат и триптофан в положениях аминокислот 239, 332 и 366 соответственно; и второй Fc-полипептид содержит аспартат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит глутамат в положении аминокислоты 332, при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с EU-индексом. В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид дополнительно содержит лейцин в положении аминокислоты 330, при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с EU-индексом. В определенных вариантах осуществления второй Fc-полипептид не содержит лейцин в положении аминокислоты 330, при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с EU-индексом.

[0009] В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит первый антигенсвязывающий фрагмент и/или второй Fc-полипептид содержит второй антигенсвязывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления первый и/или второй антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен антитела, внеклеточный домен рецептора клеточной поверхности, растворимый T-клеточный рецептор (например, T-клеточный рецептор, не содержащий эндогенные трансмембранные и цитоплазматические участки) или лиганд. В определенных вариантах осуществления первый и/или второй антигенсвязывающий фрагмент содержит VH, VL, VHH, пару VH/VL, scFv, диантитело и/или Fab. В определенных вариантах осуществления рецептор клеточной поверхности представляет собой рецептор суперсемейства фактора некроза опухоли, рецептор фактора роста эндотелия сосудов или рецептор трансформирующего фактора роста. В определенных вариантах осуществления растворимый T-клеточный

рецептор содержит внеклеточную антигенсвязывающую часть Т-клеточного рецептора, стабилизированную посредством одной или более сконструированных дисульфидных связей. В определенных вариантах осуществления растворимый Т-клеточный рецептор предусматривает одноцепочечный Т-клеточный рецептор, содержащий переменные области Т-клеточного рецептора, связанные друг с другом гибким линкером (например, пептидным линкером). В определенных вариантах осуществления лиганд представляет собой гормон или фактор роста. В определенных вариантах осуществления первый и второй антигенсвязывающие фрагменты специфически связываются с одними и теми или разными молекулами-мишенями.

[0010] В определенных вариантах осуществления первый и/или второй Fc-полипептид содержит домен CH1, шарнирную область, домен CH2 и/или домен CH3 из IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ или IgA₂ человека. В определенных вариантах осуществления первый и/или второй Fc-полипептид содержит тяжелую цепь антитела. В определенных вариантах осуществления тяжелая цепь антитела не содержит домен CH1 и/или часть шарнирной области. В определенных вариантах осуществления тяжелая цепь антитела представляет собой тяжелую цепь полноразмерного антитела. В определенных вариантах осуществления тяжелая цепь антитела представляет собой тяжелую цепь из человеческого IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ или IgA₂.

[0011] В определенных вариантах осуществления первый и/или второй Fc-полипептид дополнительно содержит легкую цепь антитела. В определенных вариантах осуществления легкая цепь антитела представляет собой человеческую легкую каппа- или лямбда-цепь.

[0012] В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид предусматривает первое полуантитело, содержащее тяжелую цепь первого антитела и легкую цепь первого антитела, и/или второй Fc-полипептид предусматривает второе полуантитело, содержащее тяжелую цепь второго антитела и легкую цепь второго антитела. В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид предусматривает первое полуантитело, содержащее тяжелую цепь первого антитела и легкую цепь первого антитела; и второй Fc-полипептид предусматривает второе полуантитело, содержащее тяжелую цепь второго антитела и легкую цепь второго

антитела. В определенных вариантах осуществления первое и второе полуантитела связываются с разными молекулами-мишенями или с разными областями одной и той же молекулы-мишени.

[0013] В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (необязательно на по меньшей мере 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, или 100% идентична) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1–3, 6–7, 10–11, 24–27, 48–51 и 62–65; и/или второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (необязательно на по меньшей мере 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1–3, 5, 12–13, 36–37, 60–61 и 66–67.

[0014] В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (необязательно на по меньшей мере 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1–3, 6–7, 10–11, 24–27, 48–51 и 62–65; и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (необязательно по меньшей мере на 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, 5, 12-13, 36-37, 60-61 и 66–67.

[0015] В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 1–3, 6–7, 10–11, 24–27, 48–51 и 62–65. В определенных вариантах осуществления второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 1–3, 5, 12–13, 36–37, 60–61 и 66–67.

[0016] В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид и второй Fc-полипептид содержат аминокислотные последовательности, которые на по

меньшей мере 75% идентичны (например, на по меньшей мере 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, или 100% идентичны) аминокислотным последовательностям под SEQ ID NOs: 24 и 36; 24 и 37; 25 и 36; 25 и 37; 26 и 36; 26 и 37; 27 и 36; 27 и 37; 48 и 60; 48 и 61; 49 и 60; 49 и 61; 50 и 60; 50 и 61; 51 и 60; 51 и 61; 62 и 66; 62 и 67; 63 и 66; 63 и 67; 64 и 66; 64 и 67; 65 и 66 или 65 и 67 соответственно. В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид и второй Fc-полипептид содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NOs: 24 и 36; 24 и 37; 25 и 36; 25 и 37; 26 и 36; 26 и 37; 27 и 36; 27 и 37; 48 и 60; 48 и 61; 49 и 60; 49 и 61; 50 и 60; 50 и 61; 51 и 60; 51 и 61; 62 и 66; 62 и 67; 63 и 66; 63 и 67; 64 и 66; 64 и 67; 65 и 66 или 65 и 67 соответственно.

[0017] В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 51, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 61. В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 50, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 60. В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 51, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 60. В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 50, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 61. В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 49, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 61. В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 48, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 60. В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 49,

[illegible]

первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 27, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 37. В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 26, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 36. В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 27, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 36. В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 26, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 37. В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 25, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 37. В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 24, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 36. В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 25, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 36. В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 24, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 37.

[0018] В другом аспекте настоящего изобретения представлены фармацевтические композиции, которые содержат гетеродимерные белки, раскрытые в данном документе. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит гетеродимерный белок, раскрытый в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

[0019] В другом аспекте настоящего изобретения представлены выделенные полинуклеотиды, кодирующие Fc-полипептиды, раскрытые в данном документе, векторы, содержащие полинуклеотиды, и рекомбинантные клетки-хозяева, содержащие полинуклеотиды, векторы и Fc-полипептиды, раскрытые в данном документе. В определенных вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует первый и второй Fc-полипептиды любого из гетеродимерных белков, раскрытых в данном документе. В определенных вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий первый и второй Fc-полипептиды любого из гетеродимерных белков, раскрытых в данном документе.

[0020] В определенных вариантах осуществления рекомбинантная клетка-хозяин содержит:

- a) полинуклеотид, кодирующий первый и второй Fc-полипептиды любого из гетеродимерных белков, раскрытых в данном документе;
- b) вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий первый и второй Fc-полипептиды любого из гетеродимерных белков, раскрытых в данном документе;
- c) первый полинуклеотид, кодирующий первый Fc-полипептид любого из гетеродимерных белков, раскрытых в данном документе, и второй полинуклеотид, кодирующий второй Fc-полипептид любого из гетеродимерных белков, раскрытых в данном документе;
- d) первый вектор, содержащий первый полинуклеотид, кодирующий первый Fc-полипептид любого из гетеродимерных белков, раскрытых в данном документе, и второй вектор, содержащий второй полинуклеотид, кодирующий второй Fc-полипептид любого из гетеродимерных белков, раскрытых в данном документе;
- e) первый полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь первого антитела из первого Fc-полипептида гетеродимерного белка, раскрытого в данном документе, и второй полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь второго антитела из второго Fc-полипептида гетеродимерного белка, раскрытого в данном документе, и необязательно третий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь первого антитела из первого Fc-полипептида, и/или четвертый полинуклеотид, кодирующий легкую цепь второго антитела из второго Fc-полипептида;

где первый Fc-полипептид предусматривает первое полуантитело, содержащее тяжелую цепь первого антитела и легкую цепь первого антитела; и второй Fc-полипептид предусматривает второе полуантитело, содержащее тяжелую цепь второго антитела и легкую цепь второго антитела; или

f) первый вектор, содержащий первый полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь первого антитела из первого Fc-полипептида гетеродимерного белка, раскрытого в данном документе, и второй вектор, содержащий второй полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь второго антитела из второго Fc-полипептида гетеродимерного белка, раскрытого в данном документе, и необязательно третий вектор, содержащий третий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь первого антитела первого Fc-полипептида, и/или четвертый вектор, содержащий четвертый полинуклеотид, кодирующий легкую цепь второго антитела второго Fc-полипептида,

где первый Fc-полипептид предусматривает первое полуантитело, содержащее тяжелую цепь первого антитела и легкую цепь первого антитела; и второй Fc-полипептид предусматривает второе полуантитело, содержащее тяжелую цепь второго антитела и легкую цепь второго антитела.

[0021] В другом аспекте настоящего изобретения представлены способы получения гетеродимерных белков, описанных в данном документе.

[0022] В определенных вариантах осуществления способ предусматривает осуществление экспрессии в клетке первого полинуклеотида, кодирующего первый Fc-полипептид любого из гетеродимерных белков, раскрытых в данном документе; и второго полинуклеотида, кодирующего второй Fc-полипептид любого из гетеродимерных белков, раскрытых в данном документе, в условиях, при которых продуцируется гетеродимерный белок.

[0023] В определенных вариантах осуществления настоящий способ предусматривает осуществление экспрессии в клетке:

a) первого полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь первого антитела из первого Fc-полипептида гетеродимерного белка, раскрытого в данном документе;

b) второго полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь второго антитела из второго Fc-полипептида гетеродимерного белка, раскрытого в данном документе;

c) третьего полинуклеотида, кодирующего легкую цепь первого антитела из первого Fc-полипептида; и

d) четвертого полинуклеотида, кодирующего легкую цепь второго антитела из второго Fc-полипептида,

в условиях, при которых продуцируется гетеродимерный белок,

где первый Fc-полипептид предусматривает первое полуантитело, содержащее тяжелую цепь первого антитела и легкую цепь первого антитела; и второй Fc-полипептид предусматривает второе полуантитело, содержащее тяжелую цепь второго антитела и легкую цепь второго антитела.

[0024] В определенных вариантах осуществления способ предусматривает:

a) осуществление экспрессии в первой клетке первого полинуклеотида, кодирующего первый Fc-полипептид любого из гетеродимерных белков, раскрытых в данном документе, в условиях, при которых продуцируется первый Fc-полипептид;

b) экспрессию во второй клетке второго полинуклеотида, кодирующего второй Fc-полипептид любого из гетеродимерных белков, раскрытых в данном документе, в условиях, при которых продуцируется второй Fc-полипептид; и

c) приведение в контакт первого и второго Fc-полипептидов, полученных на стадиях (a) и (b), в условиях, при которых первый Fc-полипептид и второй Fc-полипептид гетеродимеризуются с получением гетеродимерного белка.

[0025] В определенных вариантах осуществления способ предусматривает:

a) осуществление экспрессии в первой клетке первого полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь первого антитела, и второго полинуклеотида, кодирующего легкую цепь первого антитела первого Fc-полипептида гетеродимерного белка, раскрытого в данном документе, в условиях, при которых продуцируется первый Fc-полипептид;

b) осуществление экспрессии во второй клетке третьего полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь второго антитела, и четвертого полинуклеотида,

кодирующего легкую цепь второго антитела из второго Fc-полипептида гетеродимерного белка, раскрытого в данном документе, в условиях, при которых продуцируется второй Fc-полипептид; и

с) приведение в контакт первого и второго Fc-полипептидов, полученных на стадиях (a) и (b), в условиях, при которых первый Fc-полипептид и второй Fc-полипептид гетеродимеризуются с получением гетеродимерного белка,

где первый Fc-полипептид предусматривает первое полуантитело, содержащее тяжелую цепь первого антитела и легкую цепь первого антитела; и второй Fc-полипептид предусматривает второе полуантитело, содержащее тяжелую цепь второго антитела и легкую цепь второго антитела.

[0026] В определенных вариантах осуществления способ предусматривает приведение в контакт первого Fc-полипептида и второго Fc-полипептида гетеродимерного белка из любых гетеродимерных белков, раскрытых в данном документе, в условиях, при которых первый Fc-полипептид и второй Fc-полипептид гетеродимеризуются с получением гетеродимерного белка.

4. Краткое ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0027] На **фигуре 1** представлен график, на котором показаны уровни экспрессии подмножества Fc-полипептидов, описанных в таблице 3.

[0028] На **фигурах 2A и 2B** представлены графики, демонстрирующие термостабильность гетеродимерных белков BA111, BA112, BA113 и BA114 (фигура 2A; «антитело к мишени 1») и BA115, BA116, BA117 и BA118 (фигура 2B; «антитело к мишени 2»), определенную путем измерения теплового разворачивания белков.

[0029] На **фигуре 3** представлен график, на котором показано связывание гетеродимерных белков BA111, BA112, BA113, BA114, BA119 и изотипического контрольного антитела IgG₁ с клетками Jurkat, сконструированными для экспрессии высоких уровней мишени 1 на клеточной поверхности. В каждом случае степень связывания с клетками Jurkat, оцениваемая по средней интенсивности флуоресценции (MFI), нанесена на график в зависимости от концентрации гетеродимерного белка («антитела»), инкубированного с клетками.

[0030] На **фигуре 4** представлен график, на котором показано связывание

гетеродимерных белков BA115, BA116, BA117, BA118, BA120 и изотипического контрольного антитела IgG₁ с клетками СНО, сконструированными для экспрессии высоких уровней мишени 2 на клеточной поверхности. В каждом случае степень связывания с клетками СНО, оцениваемая по средней интенсивности флуоресценции (MFI), нанесена на график в зависимости от концентрации гетеродимерного белка («антитела»), инкубированного с клетками.

[0031] На **фигуре 5** представлен график, на котором показаны результаты анализов с использованием репортерного гена люциферазы, находящегося под контролем промотора IL-2, посредством которых измеряли относительную активацию Т-клеток, обусловленную блокированием мишени 1 за счет использования гетеродимерных белков BA111, BA112, BA113, BA114, BA119 или изотипического контрольного антитела IgG₁. Экспрессия люциферазы (выраженная как среднее значение относительных единиц люминесценции – RLU), суррогатного маркера активации гена IL-2, нанесена на график в зависимости от концентрации гетеродимерного белка («антитела»).

[0032] На **фигуре 6** представлен график, на котором показаны результаты анализов с использованием репортерного гена люциферазы, находящегося под контролем промотора IL-2, посредством которых измеряли относительную активацию Т-клеток, обусловленную блокированием мишени 2 за счет использования гетеродимерных белков BA115, BA116, BA117, BA118, BA120 или изотипического контрольного антитела IgG₁. Экспрессия люциферазы (выраженная как среднее значение относительных единиц люминесценции – RLU), суррогатного маркера активации гена IL-2, нанесена на график в зависимости от концентрации гетеродимерного белка («антитела»).

[0033] На **фигурах 7А – 7Р** представлены графики, на которых показана способность гетеродимерных белков BA111, BA112, BA113, BA114, BA119 и референтного гомодимерного белка 2 индуцировать секрецию IL-2 SEA-стимулированными клетками РВМС у трех разных доноров: донора 1 (фигуры 7А – 7D и фигуры 7I – 7L), донора 2 (фигуры 7Е – 7Н) и донора 3 (фигуры 7М – 7Р). В качестве изотипического контроля использовали гомодимерный изотипический белок, который содержит мутации S239D/A330L/I332E («усиленный Fc»).

Концентрация IL-2 представлена на графике в зависимости от концентрации гетеродимерного белка («антитела»).

[0034] На **фигурах 8A – 8X** представлены графики, на которых показана способность BA115, BA116, BA117, BA118 и референтного гомодимерного белка 1 индуцировать секрецию IL-2 SEA-стимулированными клетками PBMC у трех разных доноров: донора 1 (фигуры 8A – 8D и фигуры 8M – 8P), донора 2 (фигуры 8I – 8L и 8U – 8X) и донора 3 (фигуры 8E – 8H и 8Q – 8T). В качестве изотипического контроля использовали гомодимерный изотипический белок, который содержит мутации S239D/A330L/I332E («усиленный Fc»). Концентрация IL-2 представлена на графике в зависимости от концентрации гетеродимерного белка («антитела»).

[0035] На **фигурах 9A и 9B** представлен ряд графиков, демонстрирующих связывание гетеродимерных белков BA111, BA112, BA113 и BA114 с клетками CHO, экспрессирующими FcγRIIIA V/V человека на клеточной поверхности (фигура 9A), или клетками CHO, экспрессирующими FcγRIIIA F/F человека на клеточной поверхности (фигура 9B). Уровень связывания гетеродимерного белка с клетками, оцениваемый по геометрическому среднему значению интенсивности флуоресценции (MFI), нанесен на график в зависимости от концентрации гетеродимерного белка («Ab»), инкубированного с клетками.

[0036] На **фигурах 10A и 10B** представлен ряд графиков, демонстрирующих связывание гетеродимерных белков BA115, BA116, BA117 и BA118 с клетками CHO, экспрессирующими FcγRIIIA V/V человека на клеточной поверхности (фигура 10A), или клетками CHO, экспрессирующими FcγRIIIA F/F человека на клеточной поверхности (фигура 10B). Уровень связывания гетеродимерного белка с клетками, оцениваемый по геометрическому среднему значению интенсивности флуоресценции (MFI), нанесен на график в зависимости от концентрации гетеродимерного белка («Ab»), инкубированного с клетками.

[0037] На **фигурах 11A – 11G** представлен набор графиков, демонстрирующих связывание гетеродимерных белков-антител к мишени 1 с клетками CHO, экспрессирующими FcγRIIIA F/F человека на клеточной поверхности. Уровень связывания гетеродимерного белка с клетками, оцениваемый по геометрическому среднему значению интенсивности флуоресценции (MFI), наносили на график в

зависимости от концентрации гетеродимерного белка, инкубированного с клетками.

[0038] На **фигурах 12A – 12G** представлен набор графиков, демонстрирующих связывание гетеродимерных белков-антител к мишени 2 с клетками СНО, экспрессирующими FcγRIIIA F/F человека на клеточной поверхности. Уровень связывания гетеродимерного белка с клетками, оцениваемый по геометрическому среднему значению интенсивности флуоресценции (MFI), наносили на график в зависимости от концентрации гетеродимерного белка, инкубированного с клетками.

5. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0039] В данном документе представлены гетеродимерные белки (например, мультиспецифические антитела), которые проявляют усиленное связывание с FcγRIIIA по сравнению с соответствующим встречающимся в природе антителом и обладают надлежащей технологичностью получения. Гетеродимерные белки обычно содержат первый Fc-полипептид, содержащий аспартат, глутамат и триптофан в положениях аминокислот 239, 332 и 366 соответственно; и второй Fc-полипептид, содержащий аспартат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержащий глутамат в положении аминокислоты 332, при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с EU-индексом. В определенных вариантах осуществления гетеродимерные белки содержат первый Fc-полипептид, содержащий аспартат, лейцин, глутамат и триптофан в положениях аминокислот 239, 330, 332 и 366 соответственно; и второй Fc-полипептид, содержащий аспартат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержащий лейцин и глутамат в положениях аминокислот 330 и 332 соответственно, при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с EU-индексом. Такие гетеродимерные белки особенно применимы в качестве мультиспецифических связывающих белков (например, мультиспецифических антител). Также представлены фармацевтические композиции, содержащие эти гетеродимерные белки, нуклеиновые кислоты, кодирующие эти гетеродимерные белки, а также векторы экспрессии и клетки-хозяева для получения этих гетеродимерных белков.

5.1 Определения

[0040] Используемый в данном документе термин «гетеродимерный белок»

относится к белку, содержащему ковалентно или нековалентно связанный димер двух Fc-полипептидов, не являющихся идентичными.

[0041] Используемый в данном документе термин «Fc-полипептид» относится к полипептиду, содержащему домен CH2 и домен CH3, при этом С-конец домена CH2 связан (прямо или опосредованно) с N-концом домена CH3. Термин «Fc-полипептид» включает тяжелую цепь антитела, связанную с легкой цепью антитела дисульфидными связями (например, с образованием полуантитела).

[0042] Используемый в данном документе термин «домен CH1» относится к первому константному домену тяжелой цепи антитела (например, к положениям аминокислот 118–215 IgG₁ человека в соответствии с EU-индексом). Термин включает природные домены CH1 и сконструированные варианты природных доменов CH1 (например, домены CH1, содержащие одну или более аминокислотных вставок, делеций, замен или модификаций по сравнению со встречающимся в природе доменом CH1).

[0043] Используемый в данном документе термин «домен CH2» относится к второму константному домену тяжелой цепи антитела (например, к аминокислотным положениям 231–340 IgG₁ человека в соответствии с EU-индексом). Термин включает природные домены CH2 и сконструированные варианты природных доменов CH2 (например, домены CH2, содержащие одну или более аминокислотных вставок, делеций, замен или модификаций по сравнению со встречающимся в природе доменом CH2).

[0044] Используемый в данном документе термин «домен CH3» относится к третьему константному домену тяжелой цепи антитела (например, положениям аминокислот 341–447 IgG₁ человека в соответствии с EU-индексом). Термин включает природные домены CH3 и сконструированные варианты природных доменов CH2 (например, домены CH3, содержащие одну или более аминокислотных вставок, делеций, замен или модификаций по сравнению со встречающимся в природе доменом CH3).

[0045] Используемый в данном документе термин «шарнирная область» относится к части тяжелой цепи антитела, содержащей остатки цистеина (например, остатки цистеина в положениях аминокислот 226 и 229 IgG₁ человека в соответствии

с EU-индексом), которые опосредуют дисульфидное связывание между двумя тяжелыми цепями в интактном антителе. Термин включает природные шарнирные области и сконструированные варианты природных шарнирных областей (например, шарнирные области, содержащие одну или более аминокислотных вставок, делеций, замен или модификаций по сравнению со встречающейся в природе шарнирной областью). Иллюстративная полноразмерная шарнирная область IgG₁ содержит аминокислоты из положений 216–230 IgG₁ человека в соответствии с EU-индексом.

[0046] Используемый в данном документе термин «EU-индекс» относится к системе нумерации EU для константных областей антитела, описанной в публикации Edelman, GM. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969) и справочнике Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health и Human Services, 5-е издание, 1991, которые все включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Вся нумерация положений аминокислот в Fc-полипептидах или их фрагментов, используемая в данном документе, приведена в соответствии с EU-индексом.

[0047] Используемый в данном документе термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к молекуле, которая специфически связывается с антигеном таким образом, как это понимает специалист в данной области техники. Например, антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с антигеном, связывается с другими молекулами, как правило, с более низкой аффинностью, что определено, например, посредством иммуноанализов, прибора KinExA 3000 BIAcore® (Sapidyne Instruments, Бойсе, Айдахо) или других известных в данной области техники анализов. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с антигеном, связывается с данным антигеном при показателе K_A , который в по меньшей мере $2 \log$ (например, в 10 раз), $2,5 \log$, $3 \log$, $4 \log$ или больше превышает показатель K_A , при котором молекула неспецифически связывается с другим антигеном.

[0048] Используемые в данном документе термины «антитело» и «антитела» включают полноразмерные антитела, антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных антител и молекулы, содержащие CDR, VH-области и/или VL-области антитела. Примеры антител включают без ограничения: моноклональные

антитела, рекомбинантно полученные антитела, моноспецифические антитела, мультиспецифические антитела (включающие биспецифические антитела), человеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, иммуноглобулины, синтетические антитела, тетрамерные антитела, содержащие молекулы двух тяжелых цепей и двух легких цепей, мономер легкой цепи антитела, мономер тяжелой цепи антитела, димер легкой цепи антитела, димер тяжелой цепи антитела, пару легкая цепь антитела-тяжелая цепь антитела, интраантитела, гетероконъюгированные антитела, конъюгаты антитело-лекарственное средство, однодоменные антитела, моновалентные антитела, одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv (scFv), камелизированные антитела, аффиантитела, Fab-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, Fv с дисульфидной связью (sdFv), антиидиотипические (к Id) антитела (включающие, например, антитела к антителам к Id) и антигенсвязывающие фрагменты из любого вышеперечисленного. В определенных вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, относятся к популяциям поликлональных антител. Антитела могут представлять собой молекулу-иммуноглобулин любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY), любого класса (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ или IgA₂) или любого подкласса (например, IgG_{2a} или IgG_{2b}). В определенных вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, представляют собой антитела IgG или их класса (например, человеческий IgG₁ или IgG₄) или подкласса.

[0049] Используемые в данном документе термины «VH» и «VL» относятся к переменным доменам тяжелой и легкой цепей антитела соответственно, описанным в публикации Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (NIH Publication No. 91-3242, Bethesda), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0050] Используемый в данном документе термин «VHH» относится к переменному домену камелидного антитела, содержащего только тяжелую цепь (HCAb), и к его гуманизированным вариантам, что описано в публикации Hamers-Casterman C. et al., Nature (1993) 363:446–8.10.1038/363446a0, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0051] Используемый в данном документе термин «пара VH/VL» относится к

комбинации VH и VL, которые вместе образуют антигенсвязывающий участок.

[0052] Используемый в данном документе термин «тяжелая цепь», если он используется в отношении антитела, может относиться к любому отдельному типу, например, альфа (α), дельта (δ), эпсилон (ϵ), гамма (γ) и мю (μ), исходя из аминокислотной последовательности константного домена, которая дает начало антителам классов IgA, IgD, IgE, IgG и IgM соответственно, включая подклассы IgG, например, IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄.

[0053] Используемый в данном документе термин «тяжелая цепь полноразмерного антитела» относится к тяжелой цепи антитела, содержащей в направлении от N- к C-концу VH, участок CH1, шарнирную область, домен CH2 и домен CH3.

[0054] Используемый в данном документе термин «легкая цепь», если используется в отношении антитела, может относиться к любому отдельному типу, например, каппа (κ) или лямбда (λ), исходя из аминокислотной последовательности константных доменов. Аминокислотные последовательности легкой цепи хорошо известны в данной области техники. В конкретных вариантах осуществления легкая цепь представляет собой человеческую легкую цепь.

[0055] Используемый в данном документе термин «полуантитело» относится к тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, связанным друг с другом таким же образом, как и тяжелая и легкая цепи интактного иммуноглобулина дикого типа. В определенных вариантах осуществления полуантитело получают посредством восстановления дисульфидных связей между тяжелыми цепями в шарнирной области полноразмерного антитела. В определенных вариантах осуществления полуантитело получают путем экспрессии Fc-полипептида, раскрытого в данном документе, в клетке.

5.2 Гетеродимерные белки

[0056] В одном аспекте настоящего изобретения представлены гетеродимерные белки, содержащие первый и второй Fc-полипептиды, где первый Fc-полипептид содержит аминокислоты аспартат, глутамат и триптофан в положениях аминокислот 239, 332 и 366 соответственно и второй Fc-полипептид содержит аминокислоты аспартат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 366, 368 и 407

соответственно, но не содержит аминокислоту глутамат в положении аминокислоты 332, при этом положения аминокислот в каждом случае пронумерованы в соответствии с EU-индексом. В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид дополнительно содержит аминокислоту лейцин в положении аминокислоты 330, при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с EU-индексом. В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид дополнительно содержит аминокислоту лейцин в положении аминокислоты 330, а второй Fc-полипептид не содержит аминокислоту лейцин в положении аминокислоты 330, при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с EU-индексом.

[0057] В другом аспекте настоящего изобретения представлены гетеродимерные белки, содержащие первый и второй Fc-полипептиды, где первый Fc-полипептид содержит аминокислоту триптофан в положении аминокислоты 366, но не содержит аминокислоты аспартат, лейцин и глутамат в положениях аминокислот 239, 330 и 332 соответственно; и второй Fc-полипептид содержит:

(a) аминокислоты серин, аланин и валин в положениях аминокислот 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты аспартат, лейцин и глутамат в положениях аминокислот 239, 330 и 332 соответственно;

(b) аминокислоты аспартат, лейцин, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 330, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоту глутамат в положении аминокислоты 332;

(c) аминокислоты лейцин, глутамат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 330, 332, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоту аспартат в положении аминокислоты 239;

(d) аминокислоты аспартат, глутамат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 332, 366, 368 и 407 соответственно, но содержит аминокислоту лейцин в положении аминокислоты 330;

(e) аминокислоты аспартат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты лейцин и глутамат в положениях аминокислот 330 и 332 соответственно;

(f) аминокислоты лейцин, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 330, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты аспартат и глутамат в положениях аминокислот 239 и 332 соответственно; или

(g) аминокислоты глутамат, серин, аланин и валин в положении аминокислоты 332, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты аспартат и лейцин в положениях аминокислот 239 и 330 соответственно,

при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с EU-индексом.

[0058] В другом аспекте настоящего изобретения представлены гетеродимерные белки, содержащие первый и второй Fc-полипептиды, где первый Fc-полипептид содержит аминокислоты аспартат, лейцин, глутамат и триптофан в положениях аминокислот 239, 330, 332 и 366 соответственно и второй Fc-полипептид содержит:

(a) аминокислоты серин, аланин и валин в положениях аминокислот 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты аспартат, лейцин и глутамат в положениях аминокислот 239, 330 и 332 соответственно;

(b) аминокислоты аспартат, лейцин, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 330, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоту глутамат в положении аминокислоты 332;

(c) аминокислоты лейцин, глутамат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 330, 332, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоту аспартат в положении аминокислоты 239;

(d) аминокислоты аспартат, глутамат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 332, 366, 368 и 407 соответственно, но содержит аминокислоту лейцин в положении аминокислоты 330;

(e) аминокислоты аспартат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты лейцин и глутамат в положениях аминокислот 330 и 332 соответственно;

(f) аминокислоты лейцин, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 330, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты аспартат и глутамат в положениях аминокислот 239 и 332 соответственно; или

(g) аминокислоты глутамат, серин, аланин и валин в положении аминокислоты 332, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты аспартат и лейцин в положениях аминокислот 239 и 330 соответственно,

при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с EU-индексом.

[0059] В другом аспекте настоящего изобретения представлены гетеродимерные белки, содержащие первый и второй Fc-полипептиды, где первый Fc-полипептид содержит аминокислоты аспартат, лейцин и триптофан в положениях аминокислот 239, 330 и 366 соответственно, но не содержит аминокислоту глутамат в положении аминокислоты 332; и второй Fc-полипептид содержит:

(a) аминокислоты серин, аланин и валин в положениях аминокислот 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты аспартат, лейцин и глутамат в положениях аминокислот 239, 330 и 332 соответственно;

(b) аминокислоты аспартат, лейцин, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 330, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоту глутамат в положении аминокислоты 332;

(c) аминокислоты лейцин, глутамат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 330, 332, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоту аспартат в положении аминокислоты 239;

(d) аминокислоты аспартат, глутамат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 332, 366, 368 и 407 соответственно, но содержит аминокислоту лейцин в положении аминокислоты 330;

(e) аминокислоты аспартат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты лейцин и глутамат в положениях аминокислот 330 и 332 соответственно;

(f) аминокислоты лейцин, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 330, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты аспартат и глутамат в положениях аминокислот 239 и 332 соответственно; или

(g) аминокислоты глутамат, серин, аланин и валин в положении аминокислоты 332, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты аспартат и лейцин в положениях аминокислот 239 и 330 соответственно,

при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с EU-индексом.

[0060] В другом аспекте настоящего изобретения представлены гетеродимерные белки, содержащие первый и второй Fc-полипептиды, где первый Fc-полипептид содержит аминокислоты лейцин, глутамат и триптофан в положениях аминокислот 330, 332 и 366 соответственно, но не содержит аминокислоту аспартат в положении аминокислоты 239; и второй Fc-полипептид содержит:

(a) аминокислоты серин, аланин и валин в положениях аминокислот 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты аспартат, лейцин и глутамат в положениях аминокислот 239, 330 и 332 соответственно;

(b) аминокислоты аспартат, лейцин, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 330, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоту глутамат в положении аминокислоты 332;

(c) аминокислоты лейцин, глутамат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 330, 332, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоту аспартат в положении аминокислоты 239;

(d) аминокислоты аспартат, глутамат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 332, 366, 368 и 407 соответственно, но содержит аминокислоту лейцин в положении аминокислоты 330;

(e) аминокислоты аспартат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты лейцин и глутамат в положениях аминокислот 330 и 332 соответственно;

(f) аминокислоты лейцин, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 330, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты аспартат и глутамат в положениях аминокислот 239 и 332 соответственно; или

(g) аминокислоты глутамат, серин, аланин и валин в положении аминокислоты 332, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты аспартат и лейцин в положениях аминокислот 239 и 330 соответственно,

при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с EU-индексом.

[0061] В другом аспекте настоящего изобретения представлены гетеродимерные белки, содержащие первый и второй Fc-полипептиды, где первый Fc-полипептид содержит аминокислоты аспартат, глутамат и триптофан в положениях аминокислот 239, 332 и 366 соответственно, но не содержит аминокислоту лейцин в положении аминокислоты 330; и второй Fc-полипептид содержит:

(a) аминокислоты серин, аланин и валин в положениях аминокислот 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты аспартат, лейцин и глутамат в положениях аминокислот 239, 330 и 332 соответственно;

(b) аминокислоты аспартат, лейцин, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 330, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоту глутамат в положении аминокислоты 332;

(c) аминокислоты лейцин, глутамат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 330, 332, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоту аспартат в положении аминокислоты 239;

(d) аминокислоты аспартат, глутамат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 332, 366, 368 и 407 соответственно, но содержит аминокислоту лейцин в положении аминокислоты 330;

(e) аминокислоты аспартат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты лейцин и глутамат в положениях аминокислот 330 и 332 соответственно;

(f) аминокислоты лейцин, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 330, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты аспартат и глутамат в положениях аминокислот 239 и 332 соответственно; или

(g) аминокислоты глутамат, серин, аланин и валин в положении аминокислоты 332, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты аспартат и лейцин в положениях аминокислот 239 и 330 соответственно,

при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с EU-индексом.

[0062] В другом аспекте настоящего изобретения представлены гетеродимерные белки, содержащие первый и второй Fc-полипептиды, где первый Fc-полипептид содержит аминокислоты аспартат и триптофан в положениях аминокислот 239 и 366 соответственно, но не содержит аминокислоты лейцин и глутамат в положениях аминокислот 330 и 332 соответственно; и второй Fc-полипептид содержит:

(a) аминокислоты серин, аланин и валин в положениях аминокислот 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты аспартат, лейцин и глутамат в положениях аминокислот 239, 330 и 332 соответственно;

(b) аминокислоты аспартат, лейцин, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 330, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоту глутамат в положении аминокислоты 332;

(c) аминокислоты лейцин, глутамат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 330, 332, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоту аспартат в положении аминокислоты 239;

(d) аминокислоты аспартат, глутамат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 332, 366, 368 и 407 соответственно, но содержит аминокислоту лейцин в положении аминокислоты 330;

(e) аминокислоты аспартат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты лейцин и глутамат в положениях аминокислот 330 и 332 соответственно;

(f) аминокислоты лейцин, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 330, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты аспартат и глутамат в положениях аминокислот 239 и 332 соответственно; или

(g) аминокислоты глутамат, серин, аланин и валин в положении аминокислоты 332, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты аспартат и лейцин в положениях аминокислот 239 и 330 соответственно,

при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с EU-индексом.

[0063] В другом аспекте настоящего изобретения представлены гетеродимерные белки, содержащие первый и второй Fc-полипептиды, где первый Fc-полипептид содержит аминокислоты лейцин и триптофан в положениях аминокислот 330 и 366 соответственно, но не содержит аминокислоты аспартат и глутамат в положениях аминокислот 239 и 332 соответственно; и второй Fc-полипептид содержит:

(a) аминокислоты серин, аланин и валин в положениях аминокислот 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты аспартат, лейцин и глутамат в положениях аминокислот 239, 330 и 332 соответственно;

(b) аминокислоты аспартат, лейцин, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 330, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоту глутамат в положении аминокислоты 332;

(c) аминокислоты лейцин, глутамат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 330, 332, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоту аспартат в положении аминокислоты 239;

(d) аминокислоты аспартат, глутамат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 332, 366, 368 и 407 соответственно, но содержит аминокислоту лейцин в положении аминокислоты 330;

(e) аминокислоты аспартат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты лейцин и глутамат в положениях аминокислот 330 и 332 соответственно;

(f) аминокислоты лейцин, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 330, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты аспартат и глутамат в положениях аминокислот 239 и 332 соответственно; или

(g) аминокислоты глутамат, серин, аланин и валин в положении аминокислоты 332, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты аспартат и лейцин в положениях аминокислот 239 и 330 соответственно,

при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с EU-индексом.

[0064] В другом аспекте настоящего изобретения представлены гетеродимерные белки, содержащие первый и второй Fc-полипептиды, где первый Fc-полипептид содержит аминокислоты глутамат и триптофан в положениях аминокислот 332 и 366 соответственно, но не содержит аминокислоты аспартат и лейцин в положениях аминокислот 239 и 330 соответственно; и второй Fc-полипептид содержит:

(a) аминокислоты серин, аланин и валин в положениях аминокислот 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты аспартат, лейцин и глутамат в положениях аминокислот 239, 330 и 332 соответственно;

(b) аминокислоты аспартат, лейцин, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 330, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоту глутамат в положении аминокислоты 332;

(c) аминокислоты лейцин, глутамат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 330, 332, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоту аспартат в положении аминокислоты 239;

(d) аминокислоты аспартат, глутамат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 332, 366, 368 и 407 соответственно, но содержит аминокислоту лейцин в положении аминокислоты 330;

(e) аминокислоты аспартат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты лейцин и глутамат в положениях аминокислот 330 и 332 соответственно;

(f) аминокислоты лейцин, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 330, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты аспарат и глутамат в положениях аминокислот 239 и 332 соответственно; или

(g) аминокислоты глутамат, серин, аланин и валин в положении аминокислоты 332, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аминокислоты аспарат и лейцин в положениях аминокислот 239 и 330 соответственно,

при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с EU-индексом.

[0065] Fc-полипептиды, описанные в данном документе, обычно содержат домен CH2 и домен CH3, при этом C-конец домена CH2 связан (прямо или опосредованно) с N-концом домена CH3. Любой встречающийся в природе или вариантный домены CH2 и/или CH3 можно использовать в Fc-полипептидах, описанных в данном документе. Например, в определенных вариантах осуществления домен CH2 и/или CH3 представляет собой встречающийся в природе домен CH2 или CH3 из тяжелой цепи антитела IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ или IgA₂, например, из тяжелой цепи человеческого антитела IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ или IgA₂. Домены CH2 и CH3 могут быть из одной и той же или из разных тяжелых цепей антитела. В определенных вариантах осуществления Fc-полипептид содержит часть, содержащую домены CH2 и CH3, из одной тяжелой цепи антитела. В определенных вариантах осуществления домен CH2 и/или CH3 представляет собой вариант встречающегося в природе домена CH2 или CH3 соответственно. В определенных вариантах осуществления домен CH2 и/или CH3 представляет собой вариант, содержащий одну или более аминокислотных вставок, делеций, замен или модификаций по сравнению со встречающимся в природе доменом CH2 или CH3 соответственно. В определенных вариантах осуществления домен CH2 и/или CH3 представляет собой химеру из одного или более доменов CH2 или CH3 соответственно. В определенных вариантах осуществления домен CH2 содержит аминокислоты из положений 231–340 встречающейся в природе шарнирной области (например, из человеческого IgG₁) в соответствии с EU-индексом. В определенных вариантах осуществления домен CH3 содержит аминокислоты из положений 341–447 встречающейся в природе шарнирной области (например, из человеческого IgG₁) в соответствии с EU-индексом.

[0066] В определенных вариантах осуществления Fc-полипептиды, описанные в данном документе, дополнительно содержат шарнирную область, при этом С-конец шарнирной области связан (прямо или опосредованно) с N-концом домена CH2. Например, в определенных вариантах осуществления шарнирная область представляет собой встречающуюся в природе шарнирную область из тяжелой цепи антитела IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ или IgA₂, например, из тяжелой цепи человеческого антитела IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ или IgA₂. Шарнирная область может быть из одной и той же или из разных тяжелых цепей антитела по сравнению с доменами CH2 и/или CH3. В определенных вариантах осуществления шарнирная область представляет собой вариант, содержащий одну или более аминокислотных вставок, делеций, замен или модификаций по сравнению с встречающейся в природе шарнирной областью. В определенных вариантах осуществления шарнирная область представляет собой химеру из одной или более шарнирных областей. В определенных вариантах осуществления шарнирная область содержит аминокислоты из положений 226–229 встречающейся в природе шарнирной области (например, из человеческого IgG₁) в соответствии с EU-индексом. В определенных вариантах осуществления шарнирная область содержит аминокислоты из положений 216–230 встречающейся в природе шарнирной области (например, из человеческого IgG₁) в соответствии с EU-индексом. В определенных вариантах осуществления шарнирная область содержит аминокислоты из положений 216–230 встречающейся в природе шарнирной области (например, из человеческого IgG₁) в соответствии с EU-индексом. В определенных вариантах осуществления шарнирная область представляет собой вариант шарнирной области IgG₄, содержащий серин (S) в положении аминокислоты 228 в соответствии с EU-индексом.

[0067] В определенных вариантах осуществления Fc-полипептиды, описанные в данном документе, дополнительно содержат домен CH1, при этом С-конец домена CH1 связан (прямо или опосредованно) с N-концом шарнирной области. Например, в определенных вариантах осуществления домен CH1 представляет собой встречающийся в природе домен CH1 из тяжелой цепи антитела IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ или IgA₂, например, из тяжелой цепи человеческого антитела IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ или IgA₂. Домен CH1 может быть из одной и той же или из разных тяжелых цепей антитела по сравнению с шарнирной областью, доменом CH2 и/или

доменом CH3. В определенных вариантах осуществления домен CH1 представляет собой вариант, содержащий одну или более аминокислотных вставок, делеций, замен или модификаций по сравнению со встречающимся в природе доменом CH1. В определенных вариантах осуществления домен CH1 представляет собой химеру из одного или более доменов CH1. В определенных вариантах осуществления домен CH1 содержит аминокислоты из положений 118–215 встречающейся в природе шарнирной области (например, из человеческого IgG₁) в соответствии с EU-индексом.

[0068] Аминокислотные последовательности иллюстративных Fc-полипептидов или их частей представлены в таблице 1 в данном документе.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности иллюстративных Fc-полипептидов или их частей

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
IgG1m3 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV	1
Консенсусная последовательность CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKX ₁ V где X ₁ представляет собой R или K	2
Шарнирная последовательность	EPKSCDKTHTCPPCP	3
CH2 дикого типа	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAK	4
CH2 S239D	APELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAK	5
CH2 S239D/I332E	APELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP EEKTISKAK	6
CH2 S239D/A330 L/I332E	APELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLP EEKTISKAK	7

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
IgG1m3 CH3	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	8
Консенсусная последовательность CH3	GQPREPQVYTLPPSRX ₁ EX ₂ TKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEX ₃ LHNHYTQKS LSLSPG где X ₁ представляет собой Е или D; X ₂ представляет собой М или L; и X ₃ представляет собой А или G	9
IgG1m3 CH3 T366W	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	10
Консенсусная последовательность CH3 T366W	GQPREPQVYTLPPSRX ₁ EX ₂ TKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEX ₃ LHNHYTQKS LSLSPG где X ₁ представляет собой Е или D; X ₂ представляет собой М или L; и X ₃ представляет собой А или G	11
IgG1m3 CH3 T366S/L368 A/Y407V	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	12
Консенсусная последовательность CH3 T366S/L368 A/Y407V	GQPREPQVYTLPPSRX ₁ EX ₂ TKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLV KLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEX ₃ LHNHYTQKS LSLSPG где X ₁ представляет собой Е или D; X ₂ представляет собой М или L; и X ₃ представляет собой А или G	13
IgG1m3 Константная область	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	14

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Консенсусная последовательность Константная область	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKX ₁ VEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRX ₂ E X ₃ TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEX ₄ LHNHYTQKSLSLSPG где X ₁ представляет собой R или K; X ₂ представляет собой E или D; X ₃ представляет собой M или L; и X ₄ представляет собой A или G	15
IgG1m3 Константная область S239D	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	16
Консенсусная последовательность Константная область S239D	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKX ₁ VEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRX ₂ EX ₃ TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEX ₄ LHNHYTQKSLSLSPG где X ₁ представляет собой R или K; X ₂ представляет собой E или D; X ₃ представляет собой M или L; и X ₄ представляет собой A или G	17
IgG1m3 Константная область S239D/I332E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	18

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Консенсусная последовательность Константная область S239D/I332E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKX ₁ VEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRX EX ₂ TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS SCSVMHEX ₄ LHNHYTQKSLSLSPG где X ₁ представляет собой R или K; X ₂ представляет собой E или D; X ₃ представляет собой M или L и X ₄ представляет собой A или G	19
IgG1m3 Константная область S239D/A330L/I332E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	20
Консенсусная последовательность Константная область S239D/A330L/I332E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKX ₁ VEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRX EX ₂ TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS SCSVMHEX ₄ LHNHYTQKSLSLSPG где X ₁ представляет собой R или K; X ₂ представляет собой E или D; X ₃ представляет собой M или L и X ₄ представляет собой A или G	21
IgG1m3 Константная область T366W	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	22

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Консенсусная последовательность Константная область T366W	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKX ₁ VEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRX ₂ E X ₃ TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEX ₄ LHNHYTQKSLSLSPG где X ₁ представляет собой R или K; X ₂ представляет собой E или D; X ₃ представляет собой M или L и X ₄ представляет собой A или G	23
IgG1m3 Константная область S239D/A330 L/I332E/ T366W	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	24
Консенсусная последовательность Константная область S239D/A330 L/I332E/ T366W	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKX ₁ VEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRX ₂ EX ₃ TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEX ₄ LHNHYTQKSLSLSPG где X ₁ представляет собой R или K; X ₂ представляет собой E или D; X ₃ представляет собой M или L и X ₄ представляет собой A или G	25
IgG1m3 Константная область S239D/I332E / T366W	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	26

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Консенсусная последовательность Константная область S239D/I332E/T366W	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKX ₁ VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPAEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSRX ₂ EX ₃ TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEX ₄ LHNHYTQKSLSLSPG где X ₁ представляет собой R или K; X ₂ представляет собой E или D; X ₃ представляет собой M или L и X ₄ представляет собой A или G	27
IgG1m3 Константная область S239D/T366W	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	28
Консенсусная последовательность Константная область S239D/T366W	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKX ₁ VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRX ₂ EX ₃ TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEX ₄ LHNHYTQKSLSLSPG где X ₁ представляет собой R или K; X ₂ представляет собой E или D; X ₃ представляет собой M или L и X ₄ представляет собой A или G	29
IgG1m3 Константная область T366S/L368A/Y407V	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	30

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Консенсусная последовательность Константная область T366S/L368 A/Y407V	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKX ₁ VEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRX ₂ E X ₃ TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEX ₄ LHNHYTQKSLSLSPG где X ₁ представляет собой R или K; X ₂ представляет собой E или D; X ₃ представляет собой M или L и X ₄ представляет собой A или G	31
IgG1m3 Константная область S239D/A330 L/I332E/ T366S/L368 A/Y407V	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	32
Консенсусная последовательность Константная область S239D/A330 L/I332E/ T366S/L368 A/Y407V	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKX ₁ VEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRX X ₂ EX ₃ TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEX ₄ LHNHYTQKSLSLSPG где X ₁ представляет собой R или K; X ₂ представляет собой E или D; X ₃ представляет собой M или L и X ₄ представляет собой A или G	33
IgG1m3 Константная область S239D/I332E / T366S/L368 A/Y407V	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	34

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Консенсусная последовательность Константная область S239D/I332E / T366S/L368 A/Y407V	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKX ₁ VEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRX EX ₂ TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS SCSVMHEX ₄ LHNHYTQKSLSLSPG где X ₁ представляет собой R или K; X ₂ представляет собой E или D; X ₃ представляет собой M или L и X ₄ представляет собой A или G	35
IgG1m3 Константная область S239D/ T366S/L368 A/Y407V	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN YKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	36
Консенсусная последовательность Константная область S239D/ T366S/L368 A/Y407V	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKX ₁ VEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRX ₂ EX ₃ TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS SCSVMHEX ₄ LHNHYTQKSLSLSPG где X ₁ представляет собой R или K; X ₂ представляет собой E или D; X ₃ представляет собой M или L и X ₄ представляет собой A или G	37
IgG1m3 Константная область CH2-CH3	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS GDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	38

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Консенсусная последовательность Константная область CH2-CH3	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRX ₁ EX ₂ TKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEX ₃ L HNHYTQKSLSLSPG где X ₁ представляет собой E или D; X ₂ представляет собой M или L и X ₃ представляет собой A или G	39
IgG1m3 Константная область CH2-CH3 S239D	APELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH HNHYTQKSLSLSPG	40
Консенсусная последовательность Константная область CH2-CH3 S239D	APELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRX ₁ EX ₂ TKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEX ₃ L HNHYTQKSLSLSPG где X ₁ представляет собой E или D; X ₂ представляет собой M или L и X ₃ представляет собой A или G	41
IgG1m3 Константная область CH2-CH3 S239D/I332E	APELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP EETISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH HNHYTQKSLSLSPG	42
Консенсусная последовательность Константная область CH2-CH3 S239D/I332E	APELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP EETISKAKGQPREPQVYTLPPSRX ₁ EX ₂ TKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEX ₃ L HNHYTQKSLSLSPG где X ₁ представляет собой E или D; X ₂ представляет собой M или L и X ₃ представляет собой A или G	43

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
IgG1m3 Константная область CH2-CH3 S239D/A330 L/I332E	APELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLP EEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	44
Консенсусная последовательность Константная область CH2-CH3 S239D/A330 L/I332E	APELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLP EEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRX ₁ EX ₂ TKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEX ₃ L HNHYTQKSLSLSPG где X ₁ представляет собой E или D; X ₂ представляет собой M или L и X ₃ представляет собой A или G	45
IgG1m3 Константная область CH2-CH3 T366W	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	46
Консенсусная последовательность Константная область CH2-CH3 T366W	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRX ₁ EX ₂ TKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEX ₃ L HNHYTQKSLSLSPG где X ₁ представляет собой E или D; X ₂ представляет собой M или L и X ₃ представляет собой A или G	47
IgG1m3 Константная область CH2-CH3 S239D/A330 L/I332E/ T366W	APELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLP EEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG	48

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Консенсусная последовательность Константная область CH2-CH3 S239D/A330 L/I332E/ T366W	APELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLP EEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRX ₁ EX ₂ TKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEX ₃ L HNHYTQKSLSLSPG где X ₁ представляет собой E или D; X ₂ представляет собой M или L и X ₃ представляет собой A или G	49
IgG1m3 Константная область CH2-CH3 S239D/I332E / T366W	APELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP EEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG	50
Консенсусная последовательность Константная область CH2-CH3 S239D/I332E / T366W	APELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP EEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRX ₁ EX ₂ TKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEX ₃ L HNHYTQKSLSLSPG где X ₁ представляет собой E или D; X ₂ представляет собой M или L и X ₃ представляет собой A или G	51
IgG1m3 Константная область CH2-CH3 S239D/ T366W	APELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH HNHYTQKSLSLSPG	52
Консенсусная последовательность Константная область CH2-CH3 S239D/ T366W	APELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRX ₁ EX ₂ TKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEX ₃ L HNHYTQKSLSLSPG где X ₁ представляет собой E или D; X ₂ представляет собой M или L и X ₃ представляет собой A или G	53

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
IgG1m3 Константная область CH2-CH3 T366S/L368 A/Y407V	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	54
Консенсусная последовательность Константная область CH2-CH3 T366S/L368 A/Y407V	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRX ₁ EX ₂ TKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEX ₃ L HNHYTQKSLSLSPG где X ₁ представляет собой E или D; X ₂ представляет собой M или L и X ₃ представляет собой A или G	55
IgG1m3 Константная область CH2-CH3 S239D/A330 L/I332E/ T366S/L368 A/Y407V	APELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLP EETISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	56
Консенсусная последовательность Константная область CH2-CH3 S239D/A330 L/I332E/ T366S/L368 A/Y407V	APELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLP EETISKAKGQPREPQVYTLPPSRX ₁ EX ₂ TKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEX ₃ L HNHYTQKSLSLSPG где X ₁ представляет собой E или D; X ₂ представляет собой M или L и X ₃ представляет собой A или G	57
IgG1m3 Константная область CH2-CH3 S239D/I332E / T366S/L368 A/Y407V	APELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP EETISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	58

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Консенсусная последовательность Константная область CH2-CH3 S239D/I332E / T366S/L368 A/Y407V	APELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP EEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRX ₁ EX ₂ TKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEX ₃ L HNHYTQKSLSLSPG где X ₁ представляет собой E или D; X ₂ представляет собой M или L и X ₃ представляет собой A или G	59
IgG1m3 Константная область CH2-CH3 S239D/ T366S/L368 A/Y407V	APELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	60
Консенсусная последовательность Константная область CH2-CH3 S239D/ T366S/L368 A/Y407V	APELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRX ₁ EX ₂ TKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEX ₃ L HNHYTQKSLSLSPG где X ₁ представляет собой E или D; X ₂ представляет собой M или L и X ₃ представляет собой A или G	61
IgG1m3 Fc-область S239D/A330 L/I332E/ T366W	CPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	62
Консенсусная последовательность Fc-область S239D/A330 L/I332E/ T366W	CPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRX ₁ EX ₂ TK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEX ₃ LHNHYTQKSLSLSPG где X ₁ представляет собой E или D; X ₂ представляет собой M или L и X ₃ представляет собой A или G	63

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
IgG1m3 Fc-область S239D/I332E / T366W	CPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	64
Консенсусная последовательность Fc-область S239D/I332E / T366W	CPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRX ₁ EX ₂ TK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEX ₃ LHNHYTQKSLSLSPG где X ₁ представляет собой E или D; X ₂ представляет собой M или L и X ₃ представляет собой A или G	65
IgG1m3 Fc-область S239D/ T366S/L368 A/Y407V	CPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	66
Консенсусная последовательность Fc-область S239D/ T366S/L368 A/Y407V	CPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRX ₁ EX ₂ TK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT PPVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEX ₃ LHNHYTQKSLSLSPG где X ₁ представляет собой E или D; X ₂ представляет собой M или L и X ₃ представляет собой A или G	67
IgG1m3 Константная область S239D/A330 L/T366W	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPLPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	68

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
IgG1m3 Константная область A330L/ T366W	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPLPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	69
IgG1m3 Константная область I332E/ T366W	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	70
IgG1m3 Константная область S239D/A330 L/ T366S/L368 A/Y407V	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPLPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	71
IgG1m3 Константная область A330L/I332E / T366S/L368 A/Y407V	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	72

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
IgG1m3 Константная область A330L/ T366S/L368 A/Y407V	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPLPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	73
IgG1m3 Константная область I332E/ T366S/L368 A/Y407V	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	74
IgG1m3 Константная область A330L/I332E / T366W	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	75
IgG1m3 Fc-область S239D/A330 L/T366W	CPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPLPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	76
IgG1m3 Fc-область A330L/ T366W	CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPLPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	77

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
IgG1m3 Fc-область I332E/ T366W	CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	78
IgG1m3 Fc-область S239D/A330 L/ T366S/L368 A/Y407V	CPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPLPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	79
IgG1m3 Fc-область A330L/I332E / T366S/L368 A/Y407V	CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	80
IgG1m3 Fc-область A330L/ T366S/L368 A/Y407V	CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPLPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	81
IgG1m3 Fc-область I332E/ T366S/L368 A/Y407V	CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	82
IgG1m3 Fc-область A330L/I332E / T366W	CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	83

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
IgG1m3 Fc-область T366W	CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	84
IgG1m3 Fc-область S239D/T366 W	CPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	85
IgG1m3 Fc-область T366S/L368 A/Y407V	CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	86
IgG1m3 Fc-область S239D/I332E / T366S/L368 A/Y407V	CPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	87

[0069] В определенных вариантах осуществления гетеродимерный белок содержит первый Fc-полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, на по меньшей мере 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична) аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 48, 49, 50, 51, 62, 63, 64 или 65; и/или второй Fc-полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, на по меньшей мере 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, или 100% идентична) аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 36, 37, 60, 61, 66 или 67. В определенных вариантах осуществления первый Fc-полинуклеотид содержит аминокислотную

последовательность под SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 48, 49, 50, 51, 62, 63, 64 или 65 и/или второй Fc-полинуклеотид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 36, 37, 60, 61, 66 или 67. Иллюстративные пары аминокислотных последовательностей, которые могут быть встроены в первый и второй Fc-полипептиды гетеродимерных белков, представлены в таблице 2 в данном документе. В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид и второй Fc-полипептид соответственно содержат аминокислотные последовательности, представленные в первом и втором столбцах любой строки в таблице 2.

Таблица 2. Иллюстративные пары аминокислотных последовательностей, которые могут быть встроены в первый и второй Fc-полипептиды

SEQ ID NO последовательности первого Fc-полипептида	SEQ ID NO последовательности второго Fc-полипептида
24	36
24	37
25	36
25	37
26	36
26	37
27	36
27	37
48	60
48	61
49	60
49	61
50	60
50	61
51	60

SEQ ID NO последовательности первого Fc-полипептида	SEQ ID NO последовательности второго Fc-полипептида
51	61
62	66
62	67
63	66
63	67
64	66
64	67
65	66
65	67

[0070] В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид и второй Fc-полипептид содержат аминокислотные последовательности, которые на по меньшей мере 75% идентичны (например, на по меньшей мере 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, или 100% идентичны) аминокислотной последовательности под SEQ ID NOs: 24 и 36; 24 и 37; 25 и 36; 25 и 37; 26 и 36; 26 и 37; 27 и 36; 27 и 37; 48 и 60; 48 и 61; 49 и 60; 49 и 61; 50 и 60; 50 и 61; 51 и 60; 51 и 61; 62 и 66; 62 и 67; 63 и 66; 63 и 67; 64 и 66; 64 и 67; 65 и 66 или 65 и 67 соответственно. В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид и второй Fc-полипептид содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NOs: 24 и 36; 24 и 37; 25 и 36; 25 и 37; 26 и 36; 26 и 37; 27 и 36; 27 и 37; 48 и 60; 48 и 61; 49 и 60; 49 и 61; 50 и 60; 50 и 61; 51 и 60; 51 и 61; 62 и 66; 62 и 67; 63 и 66; 63 и 67; 64 и 66; 64 и 67; 65 и 66 или 65 и 67 соответственно.

[0071] В одном из вариантов осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22 и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30, 34, 36, 71, 72, 73 или 74. В другом варианте осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24 и второй Fc-полипептид

или 87. В другом варианте осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 83 и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 66, 79, 80, 81, 82, 86 или 87. В другом варианте осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 85 и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 66, 79, 80, 81, 82, 86 или 87. В другом варианте осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 77 и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 66, 79, 80, 81, 82, 86 или 87. В другом варианте осуществления первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 78 и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 66, 79, 80, 81, 82, 86 или 87.

[0073] В определенных вариантах осуществления первый и/или второй Fc-полипептид дополнительно содержит один или более антигенсвязывающих фрагментов. Антигенсвязывающий фрагмент может быть связан (прямо или опосредованно) с любой частью Fc-полипептида. Например, антигенсвязывающие фрагменты могут быть связаны (прямо или опосредованно) с N- и/или C-концом Fc-полипептида. Дополнительно или альтернативно антигенсвязывающие фрагменты могут быть соединены друг с другом последовательно в Fc-полипептиде.

[0074] В определенных вариантах осуществления каждый из первого и второго Fc-полипептидов в гетеродимерном белке содержит один или более антигенсвязывающих фрагментов. В таких вариантах осуществления каждый из антигенсвязывающих фрагментов может связываться с одними и теми же или разными антигенами. В определенных вариантах осуществления гетеродимерный белок содержит первый Fc-полипептид, содержащий первый антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с первым антигеном; и второй Fc-полипептид, содержащий второй антигенсвязывающий фрагмент, который связывается со вторым антигеном, где первый и второй антигены являются разными (например, разными молекулами или разными областями одной и той же молекулы).

[0075] Любой тип связывающего фрагмента, который может быть связан с Fc-

полипептидом, является подходящим для использования в гетеродимерных белках, раскрытых в данном документе. В определенных вариантах осуществления связывающий фрагмент содержит вариабельный домен антитела. Примеры связывающих фрагментов, содержащих вариабельный домен антитела, включают без ограничения VH, VL, VHH, пару VH/VL, scFv, диантитело или Fab. В определенных вариантах осуществления связывающий фрагмент содержит лиганд. Иллюстративные лиганды включают без ограничения гормоны и факторы роста, а также их аналоги и миметики. В определенных вариантах осуществления связывающий фрагмент содержит внеклеточный домен рецептора клеточной поверхности. Иллюстративные рецепторы клеточной поверхности включают без ограничения рецептор суперсемейства фактора некроза опухоли, рецептор фактора роста эндотелия сосудов или рецептор трансформирующего фактора роста. В данной области техники хорошо известно, что такие внеклеточные домены рецепторов клеточной поверхности можно использовать для блокирования природных лигандов рецепторов. Другие связывающие фрагменты, подходящие для применения в гетеродимерных белках, раскрытых в данном документе, включают без ограничения липокалина (см., например, публикацию Gebauer M. et al., 2012, *Method Enzymol* 503:157–188, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), аднектины (см., например, публикацию Lipovsek D., 2011, *Protein Eng Des Sel* 24:3–9, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), авимеры (см., например, публикацию Silverman J. et al., 2005, *Nat Biotechnol* 23:1556–1561, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), финомеры (см., например, публикацию Schlatter D. et al., 2012, *mAbs* 4:497–508, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), домены Куница (см., например, публикацию Hosse R.J. et al., 2006, *Protein Sci* 15:14–27, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), ноттинсы (см., например, публикацию Kintzing J.R. et al., 2016, *Curr Opin Chem Biol* 34:143–150, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), аффиантитела (см., например, публикацию Feldwisch J. et al., 2010 *J Mol Biol* 398:232–247, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте) и DARPin (см., например, публикацию Pluckthun A., 2015, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 55:489–511, которая включена в данный документ посредством

ссылки во всей своей полноте).

[0076] В определенных вариантах осуществления каждый из первого и/или второго Fc-полипептидов в гетеродимерном белке содержит тяжелую цепь антитела. Тяжелая цепь антитела может представлять собой тяжелую цепь полноразмерного антитела или тяжелую цепь варианта антитела, содержащую одну или более аминокислотных вставок, делеций, замен или модификаций по сравнению со встречающейся в природе тяжелой цепью полноразмерного антитела. В определенных вариантах осуществления в тяжелой цепи антитела отсутствует домен СН1 или имеются мутации в домене СН1 или вариабельном домене тяжелой цепи, которые предотвращают ассоциацию тяжелой цепи с легкой цепью антитела. В определенных вариантах осуществления в тяжелой цепи антитела отсутствует часть шарнирной области.

[0077] Любой вид и изотип тяжелой цепи антитела можно использовать в гетеродимерных белках, раскрытых в данном документе. В определенных вариантах осуществления первый и/или второй Fc-полипептид содержит тяжелую цепь человеческого антитела IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ или IgA₂ или ее вариант. В определенных вариантах осуществления первый и/или второй Fc-полипептид содержит тяжелую цепь антитела, которая представляет собой химеру из одной или более тяжелых цепей человеческого антитела IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ или IgA₂.

[0078] В определенных вариантах осуществления первый и/или второй Fc-полипептид содержит тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела (например, человеческую легкую цепь каппа- или лямбда-цепь). Легкая цепь может быть связана (прямо или опосредованно) с любой частью тяжелой цепи антитела. В определенных вариантах осуществления тяжелая цепь антитела и легкая цепь антитела связаны друг с другом дисульфидными связями, за счет чего они образуют полуантитело.

[0079] В определенных вариантах осуществления гетеродимерный белок содержит первый Fc-полипептид, содержащий тяжелую цепь первого антитела и легкую цепь первого антитела, которые образуют первое полуантитело; и второй Fc-полипептид, содержащий тяжелую цепь второго антитела и легкую цепь второго антитела, которые образуют второе полуантитело. Первое и второе полуантитела могут связываться с одним и тем же антигеном или с разными антигенами (например,

с разными молекулами или разными областями одной и той же молекулы).

[0080] В определенных вариантах осуществления домен СНЗ любого из первого и/или второго Fc-полипептидов, раскрытых в данном документе, дополнительно содержит С-концевой лизин. Например, в определенных вариантах осуществления любая из раскрытых в таблице 1 аминокислотных последовательностей, содержащих домен СНЗ, может дополнительно содержать лизин с С-конца домена СНЗ.

[0081] В определенных вариантах осуществления гетеродимерные белки, раскрытые в данном документе, демонстрируют улучшенные биофизические свойства (например, уровни экспрессии, растворимость, термостабильность, технологичность получения и/или иммуногенность) по сравнению с соответствующим гетеродимерным белком предшествующего уровня техники (например, мультиспецифическим антителом). В определенных вариантах осуществления гетеродимерные белки, раскрытые в данном документе, демонстрируют улучшенные термостабильность и технологичность получения.

5.3 Фармацевтические композиции

[0082] В данном документе представлены композиции, содержащие гетеродимерный белок требуемой степени чистоты в физиологически приемлемом носителе, вспомогательном веществе или стабилизаторе (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Истон, Пенсильвания). Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают буферы, такие как фосфатный, цитратный и на основе других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды,

дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; металлокомплексы (например, Zn-белковые комплексы) и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

[0083] В конкретном варианте осуществления фармацевтические композиции содержат раскрытый в данном документе гетеродимерный белок и необязательно одно или более дополнительных профилактических или терапевтических средств в фармацевтически приемлемом носителе. В конкретном варианте осуществления фармацевтические композиции содержат эффективное количество раскрытого в данном документе гетеродимерного белка и необязательно одно или более дополнительных профилактических или терапевтических средств в фармацевтически приемлемом носителе. В определенных вариантах осуществления гетеродимерный белок является единственным активным ингредиентом, включенным в фармацевтическую композицию. Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть применимы для лечения такого патологического состояния, как рак, или инфекционного заболевания. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции по настоящему изобретению, содержащей гетеродимерный белок по настоящему изобретению, предназначенной для применения в качестве лекарственного средства. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции по настоящему изобретению, предназначенной для применения в способе лечения рака или инфекционного заболевания.

[0084] Фармацевтически приемлемые носители, используемые в парентеральных препаратах, включают водные носители, неводные носители, противомикробные средства, изотонические средства, буферы, антиоксиданты, местные анестетики, суспендирующие и диспергирующие средства, эмульгаторы, комплексообразующие или хелатирующие средства и другие фармацевтически приемлемые вещества. Примеры водных носителей включают инъекционный раствор хлорида натрия, инъекционный раствор Рингера, инъекционный изотонический раствор декстрозы, инъекционный раствор стерильной воды, инъекционный раствор

декстрозы и лактата Рингера. Неводные парентеральные носители включают нелетучие масла растительного происхождения, хлопковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло и арахисовое масло. К парентеральным препаратам, упакованным в многодозовые контейнеры, могут быть добавлены противомикробные средства в бактериостатических или фунгистатических концентрациях, которые включают фенолы или крезолы, соединения ртути, бензиловый спирт, хлорбутанол, сложные метиловые и пропиловые эфиры пара-гидроксибензойной кислоты, тимеросал, хлорид бензалкония и хлорид бензетония. Изотонические средства включают хлорид натрия и декстрозу. Буферы включают фосфатный и цитратный буферы. Антиоксиданты включают бисульфат натрия. Местные анестетики включают прокаина гидрохлорид. К суспендирующим и диспергирующим средствам относятся натрийкарбоксиметилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза и поливинилпирролидон. Эмульгаторы включают полисорбат 80 (TWEEN® 80). Комплексообразующие или хелатирующие ионы металлов средства включают ЭДТА. Фармацевтические носители также включают этиловый спирт, полиэтиленгликоль и пропиленгликоль для смешиваемых с водой сред-носителей и гидроксид натрия, хлористоводородную кислоту, лимонную кислоту или молочную кислоту для коррекции pH.

[0085] Фармацевтическая композиция может быть составлена для любого пути введения субъекту. Конкретные примеры путей введения включают интраназальный, пероральный, легочный, чрескожный, внутрикожный и парентеральный. Парентеральное введение, определяемое подкожной, внутримышечной или внутривенной инъекциями, также рассматривается в данном документе. Инъекционные препараты могут быть приготовлены в обычных формах, либо в виде жидких растворов или суспензий, либо в виде твердых форм, подходящих для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией, либо в виде эмульсий. Инъекционные препараты, растворы и эмульсии также содержат одно или более вспомогательных веществ. Подходящими вспомогательными веществами являются, например, вода, физиологический солевой раствор, декстроза, глицерин или этанол. Кроме того, при необходимости вводимые фармацевтические композиции также могут содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие средства или эмульгаторы, буферизующие средства

для доведения pH, стабилизаторы, усилители растворимости и другие подобные средства, такие как, например, ацетат натрия, монолаурат сорбитана, олеат триэтаноламина и циклодекстрины.

[0086] Препараты для парентерального введения гетеродимерного белка включают готовые для инъекций стерильные растворы, стерильные сухие растворимые продукты, такие как лиофилизированные порошки, готовые для смешивания с растворителем непосредственно перед применением, в том числе таблетки для подкожных инъекций, стерильные суспензии, готовые для инъекций, стерильные сухие нерастворимые продукты, готовые к смешиванию со средой-носителем непосредственно перед применением, и стерильные эмульсии. Растворы могут быть как водными, так и неводными.

[0087] При внутривенном введении подходящие носители включают физиологический солевой раствор или фосфатно-буферный солевой раствор (PBS) и растворы, содержащие загустители и солюбилизующие средства, такие как глюкоза, полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль и их смеси.

[0088] Смеси для местного применения, содержащие гетеродимерный белок, готовят так, как это описано для смесей для местного и системного введения. Полученная смесь может представлять собой раствор, суспензию, эмульсию и т. п. и может быть составлена в виде кремов, гелей, мазей, эмульсий, растворов, эликсиров, лосьонов, суспензий, настоек, паст, пен, аэрозолей, растворов для промываний, спреев, суппозиторий, повязок, кожных пластырей или любых других составов, подходящих для местного применения.

[0089] Гетеродимерный белок, раскрытый в данном документе, может быть составлен в виде аэрозоля для местного применения, например, путем ингаляции (см., например, патенты США № 4044126, 4414209 и 4364923, в которых описаны аэрозоли для доставки стероида, применимого для лечения воспалительных заболеваний, в частности астмы, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Данные составы для введения в дыхательные пути могут быть в форме аэрозоля или раствора для распылителя или в виде мелкодисперсного порошка для инсуффляции, отдельно или в комбинации с инертным носителем, таким как лактоза. В таком случае диаметр частиц состава в

одном варианте осуществления будет составлять менее 50 микрон, в еще одном варианте осуществления менее 10 микрон.

[0090] Гетеродимерный белок, раскрытый в данном документе, может быть составлен для локального или местного применения, например для местного применения на коже и слизистых оболочек, таких как в глазу, в форме гелей, кремов и лосьонов и для нанесения на глаза, или для интрацестерального, или интраспинального применения. Предусматривается местное введение для чрескожной доставки, а также для введения в глаза, или нанесения на слизистую оболочку, или для ингаляционной терапии. Также можно применять растворы гетеродимерного белка для интраназального введения отдельно или в комбинации с другими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

[0091] Трансдермальные пластыри, включая устройства для ионофореза и электрофореза, хорошо известны специалистам в данной области техники и могут использоваться для введения гетеродимерного белка. Например, такие пластыри раскрыты в патентах США № 6,267,983, 6,261,595, 6,256,533, 6,167,301, 6,024,975, 6,010,715, 5,985,317, 5,983,134, 5,948,433 и 5,860,957, которые все включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте

[0092] В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая гетеродимерный белок, описанный в данном документе, представляет собой лиофилизированный порошок, который может быть восстановлен для введения в виде растворов, эмульсий и других смесей. Он также может быть восстановлен и составлен в виде твердых веществ или гелей. Лيوфилизированный порошок получают путем растворения описанного в данном документе гетеродимерного белка или его фармацевтически приемлемого производного соединения в подходящем растворителе. В определенных вариантах осуществления лиофилизированный порошок является стерильным. Растворитель может содержать вспомогательное вещество, улучшающее стабильность, или другой фармацевтический компонент порошка или восстановленного раствора, приготовленного из порошка. К вспомогательным веществам, которые могут быть использованы, относятся без ограничения декстроза, сорбит, фруктоза, кукурузный сироп, ксилит, глицерин, глюкоза, сахароза или другое подходящее средство.

Растворитель также может содержать буфер, такой как цитрат, фосфат натрия или калия, или другой аналогичный буфер, известный специалистам в данной области техники. В одном варианте осуществления с его показатель pH является приблизительно нейтральным. Проводимая в дальнейшем стерильная фильтрация раствора с последующей лиофилизацией в стандартных условиях, известных специалистам в данной области техники, обеспечивает требуемый состав. В одном варианте осуществления полученный раствор распределяют по флаконам для лиофилизации. Каждый флакон будет содержать одну дозу или несколько доз соединения. Лيوфилизированный порошок можно хранить в соответствующих условиях, таких как при температуре от приблизительно 4°C до комнатной температуры. Восстановление этого лиофилизированного порошка водой для инъекций обеспечивает состав для парентерального применения. Для восстановления лиофилизированный порошок добавляют в стерильную воду или другой подходящий носитель. Точное количество зависит от выбранного соединения. Такое количество может быть определено опытным путем.

[0093] Гетеродимерные белки и другие композиции, представленные в данном документе, также могут быть составлены для целенаправленного воздействия на конкретную ткань, рецептор или другую область тела субъекта, подлежащего лечению. Многие такие способы целенаправленного воздействия хорошо известны специалистам в данной области техники. Все такие способы целенаправленного воздействия предусматриваются в данном документе для применения с композициями по настоящему изобретению. Примеры способов целенаправленного воздействия см., например, в патентах США № 6,316,652, 6,274,552, 6,271,359, 6,253,872, 6,139,865, 6,131,570, 6,120,751, 6,071,495, 6,060,082, 6,048,736, 6,039,975, 6,004,534, 5,985,307, 5,972,366, 5,900,252, 5,840,674, 5,759,542 и 5,709,874, которые все включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В конкретном варианте осуществления гетеродимерный белок, описанный в данном документе, целенаправленно воздействует на опухоль.

[0094] Композиции, используемые для введения *in vivo*, могут быть стерильными. Это легко достигается путем фильтрации, например, через стерильные фильтрационные мембраны.

5.4 Полинуклеотиды, векторы и способы получения гетеродимерных белков

[0095] В другом аспекте в данном документе представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую Fc-полипептиды, описанные в данном документе, и векторы, например векторы, содержащие такие полинуклеотиды, предназначенные для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах (например, в *E. coli* и клетках млекопитающих). В данном документе представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие первый и/или второй Fc-полипептид гетеродимерных белков, представленных в данном документе, а также векторы, содержащие такие полинуклеотидные последовательности, например, векторы экспрессии для их эффективной экспрессии в клетках-хозяевах, например клетках млекопитающих.

[0096] Используемый в данном документе термин «выделенный» полинуклеотид или «выделенная» молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу, которая отделена от других молекул нуклеиновой кислоты, присутствующих в природном источнике (например, у мыши или человека) данной молекулы нуклеиновой кислоты. Более того, «выделенная» молекула нуклеиновой кислоты, такая как молекула кДНК, может по сути не содержать другой клеточный материал или культуральную среду при получении рекомбинантными методами или по сути не содержать химические предшественники или другие химические вещества при химическом синтезе. Например, формулировка «по сути не содержит» включает препараты на основе полинуклеотида или молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие менее приблизительно 15%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% (в частности, менее приблизительно 10%) другого материала, например клеточного материала, культуральной среды, других молекул нуклеиновых кислот, химических предшественников и/или других химических веществ. В конкретном варианте осуществления молекулу(ы) нуклеиновой кислоты, кодирующую описанный в данном документе Fc-полипептид, выделяют или очищают.

[0097] В конкретных аспектах в данном документе представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие Fc-полипептиды. В определенных аспектах в данном документе представлены

полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую первый и/или второй Fc-полипептид гетеродимерных белков, описанных в данном документе.

[0098] В данном документе также представлены полинуклеотиды, кодирующие Fc-полипептиды, которые оптимизированы, например, путем оптимизации кодонов/РНК, замены гетерологичными сигнальными последовательностями и устранения элементов нестабильности мРНК. Способы получения оптимизированных нуклеиновых кислот, кодирующих Fc-полипептиды для рекомбинантной экспрессии, путем внесения изменений в кодоны и/или удаления ингибиторных областей в мРНК, могут быть осуществлены путем адаптации способов оптимизации, описанных, например, в патентах США № 5965726; 6174666; 6291664; 6414132 и 6794498 соответственно, которые все включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Например, потенциальные сайты сплайсинга и элементы нестабильности (например, элементы, богатые А/Т или А/У) в РНК могут быть мутированы без изменения аминокислот, кодируемых последовательностями нуклеиновых кислот, для повышения стабильности РНК с целью рекомбинантной экспрессии. При изменениях используют вырожденность генетического кода, например, используя альтернативный кодон для идентичной аминокислоты. В определенных вариантах осуществления может быть необходимым изменить один или более кодонов для кодирования консервативной мутации, например, аналогичной аминокислоты с аналогичной химической структурой и свойствами и/или функцией исходной аминокислоты. Такие способы могут обеспечивать повышение экспрессии Fc-полипротеина в по меньшей мере 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз или больше по сравнению с экспрессией Fc-полипротеина, кодируемого полинуклеотидами, которые не были оптимизированы.

[0099] В определенных вариантах осуществления оптимизированная полинуклеотидная последовательность, кодирующая Fc-полипептид, может быть гибридизована с антисмысловым (например, комплементарным) полинуклеотидом неоптимизированной полинуклеотидной последовательности, кодирующей Fc-полипептид, описанный в данном документе. В конкретных вариантах осуществления оптимизированная нуклеотидную последовательность, кодирующую Fc-полипептид,

описанный в данном документе, гибридизуют в условиях высокой жесткости с антисмысловым полинуклеотидом неоптимизированной полинуклеотидной последовательности, кодирующей Fc-полипептид, описанный в данном документе. В конкретном варианте осуществления оптимизированную нуклеотидную последовательность, кодирующую Fc-полипептид, описанный в данном документе, гибридизуют в условиях высокой жесткости, умеренной или более низкой жесткости с антисмысловым полинуклеотидом неоптимизированной нуклеотидной последовательности, кодирующей Fc-полипептид, описанный в данном документе. Информация относительно условий гибридизации описана в, например, публикации заявки на патент США № US 2005/0048549 (например, абзацы 72–73), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00100] Полинуклеотиды можно получить, а затем определить нуклеотидную последовательность данных полинуклеотидов с помощью любого способа, известного в данной области техники. Нуклеотидные последовательности, кодирующие Fc-полипептиды, описанные в данном документе, и модифицированные варианты данных Fc-полипептидов можно определить с помощью способов, хорошо известных в данной области техники, т. е. кодоны нуклеотидов, которые, как известно, кодируют определенные аминокислоты, собирают таким образом, чтобы получить нуклеиновую кислоту, которая кодирует Fc-полипептид. Такой полинуклеотид, кодирующий Fc-полипептид, можно собрать из химически синтезированных олигонуклеотидов (например, как описано в публикации Kutmeier G et al., (1994), BioTechniques 17: 242-6, включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), что, если вкратце, включает синтез перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих части последовательности, кодирующей Fc-полипептид, отжиг и лигирование этих олигонуклеотидов, а затем амплификацию лигированных олигонуклеотидов с помощью ПЦР.

[00101] Альтернативно полинуклеотид, кодирующий Fc-полипептид, описанный в данном документе, можно получить из нуклеиновой кислоты из подходящего источника посредством методов, хорошо известных в данной области техники (например, ПЦР и других методов молекулярного клонирования). Способы ПЦР-амплификации можно использовать для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую первый и/или второй Fc-полипептид

гетеродимерного белка. Амплифицированные нуклеиновые кислоты можно клонировать в векторы для экспрессии в клетках-хозяевах и для дальнейшего клонирования.

[00102] Если недоступен клон, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую конкретный Fc-полипептид, но известна последовательность молекулы Fc-полипептида, нуклеиновую кислоту, кодирующую Fc-полипептид, можно химически синтезировать или получить из подходящего источника (например, библиотека кДНК, полученная из нуклеиновой кислоты, предпочтительно поли A + РНК, выделенной из любой ткани или клеток, экспрессирующих Fc-полипептид) посредством ПЦР-амплификации с использованием синтетических праймеров, способных гибридизоваться с 3'- и 5'-концами последовательности, или посредством клонирования с использованием олигонуклеотидного зонда, специфичного для конкретной последовательности гена, для идентификации, например, клона кДНК из библиотеки кДНК, которая кодирует данный Fc-полипептид. Амплифицированные нуклеиновые кислоты, полученные посредством ПЦР, затем можно клонировать в реплицируемые клонирующие векторы с использованием любого способа, хорошо известного в данной области техники.

[00103] ДНК, кодирующую Fc-полипептиды, описанные в данном документе, можно легко выделить и секвенировать с использованием стандартных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими гетеродимерный белок). После выделения ДНК можно поместить в векторы экспрессии, которыми затем трансфицируют клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки COS обезьян, клетки яичника китайского хомячка (CHO) (например, клетки CHO из системы CHO GS System™ (Lonza)) или клетки миеломы, которые в остальном не продуцируют Fc-полипептид, для обеспечения синтеза Fc-полипептида в рекомбинантных клетках-хозяевах.

[00104] Также представлены полинуклеотиды, которые гибридизуются в условиях гибридизации высокой жесткости, умеренной или более низкой жесткости с полинуклеотидами, кодирующими Fc-полипептид, описанный в данном документе. В конкретных вариантах осуществления полинуклеотиды, описанные в данном

документе, гибридизуются в условиях гибридизации высокой жесткости, умеренной или более низкой жесткости с полинуклеотидами, кодирующими первый и/или второй Fc-полипептид гетеродимерного белка, представленного в данном документе.

[00105] Условия гибридизации описаны в данной области техники и известны специалистам в данной области техники. Например, гибридизация в жестких условиях может включать гибридизацию со связанной с фильтром ДНК в 6-кратном растворе хлорида натрия/цитрата натрия (SSC) при температуре приблизительно 45°C с последующей одной или более промывками в 0,2-кратном SSC/0,1% SDS при температуре приблизительно 50–65°C; гибридизация в очень жестких условиях может включать гибридизацию со связанной с фильтром нуклеиновой кислотой в 6-кратном SSC при температуре приблизительно 45°C с последующей одной или более промывками в 0,1-кратном SSC/0,2% SDS при температуре приблизительно 68°C. Гибридизация в других жестких условиях гибридизации известна специалистам в данной области техники и была описана, например, в справочнике Ausubel FM et al., eds., (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York, страницы 6.3.1-6.3.6 и 2.10.3, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00106] В определенных аспектах в данном документе представлены клетки (например, клетки-хозяева), экспрессирующие (например, рекомбинантно) Fc-полипептиды, описанные в данном документе, и соответствующие полинуклеотиды и векторы экспрессии. В данном документе представлены векторы (например, векторы экспрессии), содержащие полинуклеотиды, которые содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие Fc-полипептиды, для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах, предпочтительно в клетках млекопитающих (например, клетках CHO). В данном документе также представлены клетки-хозяева, содержащие такие векторы для рекомбинантной экспрессии Fc-полипептидов, описанных в данном документе. В конкретном аспекте в данном документе представлены способы получения Fc-полипептидов, описанных в данном документе, включающие экспрессию таких Fc-полипептидов из клетки-хозяина.

[00107] Рекомбинантная экспрессия Fc-полипептидов, описанных в

данном документе, обычно включает конструирование вектора экспрессии, содержащего полинуклеотид, который кодирует Fc-полипептид. После получения полинуклеотида, кодирующего Fc-полипептид, описанный в данном документе, вектор для продуцирования молекулы Fc-полипептида можно получить посредством технологии рекомбинантной ДНК с использованием методов, хорошо известных в данной области техники. Таким образом, в данном документе описаны способы получения белка посредством экспрессии полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую Fc-полипептид. Способы, которые хорошо известны специалистам в данной области техники, могут быть использованы для конструирования векторов экспрессии, содержащих последовательности, кодирующие Fc-полипептид, и соответствующие сигналы контроля транскрипции и трансляции. Данные способы включают, например, методы рекомбинантной ДНК *in vitro*, синтетические методы и генетическую рекомбинацию *in vivo*. Также представлены реплицируемые векторы, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую описанный в данном документе Fc-полипептид, функционально связанную с промотором.

[00108] Вектор экспрессии можно переносить в клетку (например, клетку-хозяина) посредством использования стандартных методов, а полученные клетки затем можно культивировать посредством использования обычных методов для получения Fc-полипептида, описанного в данном документе. Таким образом, в данном документе представлены клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий описанный в данном документе Fc-полипептид, который функционально связан с промотором для экспрессии таких последовательностей в клетке-хозяине. В определенных вариантах осуществления векторы, кодирующие как первый, так и второй Fc-полипептид гетеродимерного белка по отдельности, можно совместно экспрессировать в клетке-хозяине для экспрессии всего гетеродимерного белка, что подробно описано ниже. В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин содержит вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий как первый, так и второй Fc-полипептид гетеродимерного белка, описанного в данном документе. В конкретных вариантах осуществления клетка-хозяин содержит два разных вектора: первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий первый Fc-полипептид гетеродимерного белка, описанного в данном документе, и второй вектор,

содержащий полинуклеотид, кодирующий второй Fc-полипептид гетеродимерного белка. В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин содержит следующие четыре вектора: первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь первого антитела из первого полуантитела гетеродимерного белка, описанного в данном документе; второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь второго антитела из второго полуантитела гетеродимерного белка, описанного в данном документе; третий вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь первого антитела из первого полуантитела гетеродимерного белка, описанного в данном документе; и четвертый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь второго антитела из второго полуантитела гетеродимерного белка, описанного в данном документе. В определенных вариантах осуществления можно обеспечивать совместную экспрессию векторов, кодирующих по отдельности тяжелую цепь первого антитела из первого полуантитела, тяжелую цепь второго антитела из второго полуантитела, легкую цепь первого антитела из первого полуантитела и легкую цепь второго антитела из второго полуантитела, в клетке-хозяине с получением гетеродимерного белка.

[00109] В других вариантах осуществления первая клетка-хозяин содержит первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий первый Fc-полипептид гетеродимерного белка, описанного в данном документе, и вторая клетка-хозяин содержит второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий второй Fc-полипептид гетеродимерного белка, описанного в данном документе. В конкретных вариантах осуществления первый Fc-полипептид, экспрессируемый первой клеткой, связывают со вторым Fc-полипептидом из второй клетки с образованием описанного в данном документе гетеродимерного белка. В определенных вариантах осуществления первая клетка-хозяин содержит первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь первого антитела из первого полуантитела гетеродимерного белка, описанного в данном документе, и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь первого антитела из первого полуантитела гетеродимерного белка, описанного в данном документе, и вторая клетка-хозяин содержит третий вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь второго антитела из второго полуантитела

гетеродимерного белка, описанного в данном документе, и четвертый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь второго антитела из второго полуантитела гетеродимерного белка, описанного в данном документе. В определенных вариантах осуществления первое полуантитело, экспрессируемое первой клеткой, связывают со вторым полуантителом из второй клетки с образованием гетеродимерного белка, описанного в данном документе. В определенных вариантах осуществления в данном документе представлена популяция клеток-хозяев, включающая указанную первую клетку-хозяина и указанную вторую клетку-хозяина.

[00110] Для экспрессии Fc-полипептидов, описанных в данном документе, можно использовать различные системы хозяин-вектор экспрессии (см., например, патент США № 5807715, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Такие системы хозяин-экспрессия представляют собой носители, с помощью которых могут быть получены и впоследствии очищены представляющие интерес кодирующие последовательности, но также представляют собой клетки, которые способны при трансформации или трансфекции соответствующими кодирующими нуклеотидными последовательностями экспрессировать молекулы гетеродимерных белков, описанные в данном документе, *in situ*. Они включают без ограничения микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli* и *B. subtilis*), трансформированные, например, векторами экспрессии на основе рекомбинантной ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащими последовательности, кодирующие гетеродимерный белок; дрожжи (например, *Saccharomyces Pichia*), трансформированные, например, рекомбинантными векторами экспрессии для дрожжей, содержащими последовательности, кодирующие гетеродимерный белок; системы клеток насекомых, инфицированные, например, рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, бакуловирусом), содержащими последовательности, кодирующие гетеродимерный белок; системы клеток растений (например, зеленые водоросли, такие как *Chlamydomonas reinhardtii*), инфицированные, например, рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом мозаики табака, TMV), или трансформированные, например, рекомбинантными плазмидными векторами экспрессии (например,

плазмида Ti), содержащими последовательности, кодирующие гетеродимерный белок; или системы клеток млекопитающих (например, клетки COS (например, COS1 или COS), CHO, BHK, MDCK, HEK 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa и NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20 и BMT10), содержащие, например, рекомбинантные конструкции для экспрессии, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, промотор гена металлотионеина) или из вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса; промотор 7,5K вируса коровьей оспы). В конкретном варианте осуществления клетки для экспрессии описанных в данном документе гетеродимерных белков представляют собой клетки яичника китайского хомячка (CHO), например, клетки CHO из системы CHO GS System™ (Lonza). В конкретном варианте осуществления клетки для экспрессии описанных в данном документе гетеродимерных белков представляют собой человеческие клетки, например, человеческие клеточные линии. В конкретном варианте осуществления вектором экспрессии млекопитающих является pOptiVEC™ или pcDNA3.3. В конкретном варианте осуществления для экспрессии гетеродимерных белков используют бактериальные клетки, такие как *Escherichia coli*, или эукариотические клетки (например, клетки млекопитающих). Например, клетки млекопитающих, такие как клетки CHO, в сочетании с вектором, таким как главный немедленно-ранний промоторный элемент гена цитомегаловируса человека, представляют собой эффективную систему экспрессии белков, таких как антитела (публикации Foecking MK & Hofstetter H (1986) Gene 45: 101-5 и Cockett MI et al., (1990) Biotechnology 8(7): 662-7, которые все включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В определенных вариантах осуществления гетеродимерные белки, описанные в данном документе, продуцируются клетками CHO или клетками NS0. В конкретном варианте осуществления экспрессия нуклеотидных последовательностей, кодирующих описанные в данном документе гетеродимерные белки, регулируется конститутивным промотором, индуцируемым промотором или тканеспецифичным промотором.

[00111] В бактериальных системах предпочтительно может быть выбран ряд векторов экспрессии в зависимости от предполагаемого применения экспрессируемого гетеродимерного белка. Например, если необходимо получить

большое количество такого белка для создания фармацевтических композиций на основе гетеродимерных белков, могут требоваться векторы, которые определяют экспрессию высоких уровней слитых белков, которые легко очищаются. Такие векторы включают без ограничения вектор экспрессии pUR278 для *E. coli* (публикация Ruether U & Mueller-Hill B (1983) EMBO J 2: 1791-1794), в котором последовательность, кодирующая белок, может быть лигирована отдельно в вектор в рамке считывания с кодирующей областью lac Z, за счет чего образуется слитый белок; векторы pIN (публикации Inouye S & Inouye M (1985) Nuc Acids Res 13: 3101-3109; Van Heeke G & Schuster SM (1989) J Biol Chem 24: 5503-5509) и т. п., которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Например, векторы pGEX также можно использовать для экспрессии чужеродных полипептидов в виде слитых белков с глутатион-5-трансферазой (GST). Как правило, такие слитые белки являются растворимыми и могут быть легко очищены от лизированных клеток путем адсорбции и связывания с гранулами матрикса глутатион-агарозы с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. Векторы pGEX сконструированы с включением сайтов протеазного расщепления тромбина или фактора Ха, за счет чего клонированный продукт гена-мишени можно отделить от фрагмента GST.

[00112] В системе на основе насекомых вирус ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcNPV), например, можно использовать в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов. Вирус выращивают в клетках *Spodoptera frugiperda*. Последовательность, кодирующую белок, можно клонировать отдельно во второстепенные области (например, ген полиэдрина) вируса и поместить под контроль промотора AcNPV (например, промотора гена полиэдрина).

[00113] В клетках-хозяевах млекопитающих можно использовать ряд систем экспрессии на основе вирусов. В тех случаях, когда в качестве вектора экспрессии используется аденовирус, представляющую интерес последовательность, кодирующую белок, можно лигировать с комплексом контроля транскрипции/трансляции аденовируса, например, с поздним промотором и тройной лидерной последовательностью. Затем этот химерный ген можно встроить в геном аденовируса посредством рекомбинации *in vitro* или *in vivo*. Вставка во второстепенную область вирусного генома (например, область E1 или E3)

обеспечивает получение рекомбинантного вируса, который является жизнеспособным и способен экспрессировать гетеродимерный белок у инфицированных хозяев (например, см. публикацию Logan J & Shenk T (1984) PNAS 81(12): 3655-9, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Специфические сигналы инициации также могут быть необходимы для эффективной трансляции встроенных последовательностей, кодирующих белок. Данные сигналы включают кодон инициации ATG и смежные последовательности. Кроме того, кодон инициации должен быть в фазе с рамкой считывания требуемой кодирующей последовательности, чтобы обеспечить трансляцию всей вставки. Данные экзогенные сигналы контроля трансляции и кодоны инициации могут иметь различное происхождение, как природное, так и синтетическое. Эффективность экспрессии можно повысить за счет включения соответствующих элементов-энхансеров транскрипции, терминаторов транскрипции и т. д. (см., например, справочник Bitter G et al., (1987) *Methods Enzymol.* 153: 516-544, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[00114] Кроме того, можно выбрать штамм клетки-хозяина, который модулирует экспрессию встроенных последовательностей или осуществляет модифицирование и процессинг генного продукта специфическим требуемым путем. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессинг (например, расщепление) белковых продуктов могут быть важны для функции белка. Различные клетки-хозяева имеют характерные и специфические механизмы посттрансляционного процессинга и модификации белков и генных продуктов. Подходящие клеточные линии или системы-хозяева можно выбрать для обеспечения правильной модификации и процессинга экспрессируемого чужеродного белка. С этой целью можно использовать эукариотические клетки-хозяева, которые обладают клеточным механизмом для надлежащего процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. Такие клетки-хозяева млекопитающих включают без ограничения клетки CHO, VERO, BHK, Hela, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 и T47D, NS0 (линия клеток мышины миеломы, которая эндогенно не продуцирует какие-либо цепи иммуноглобулина), CRL7030, COS (например, COS1 или COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 и

HsS78Bst. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе гетеродимерные белки продуцируются в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO.

[00115] В конкретном варианте осуществления описанные в данном документе гетеродимерные белки характеризуются пониженным содержанием фукозы или не содержат фукозу. Такие белки могут быть получены с использованием методов, известных специалисту в данной области техники. Например, Fc-полипептиды, описанные в данном документе, могут экспрессироваться в клетках с дефицитом или отсутствием способности к фукозилрованию. В конкретном примере клеточные линии с нокаутом обоих аллелей α 1,6-фукозилтрансферазы можно использовать для получения Fc-полипептидов с пониженным содержанием фукозы. Система Potelligent® (Lonza) является примером такой системы, которую можно использовать для получения Fc-полипептидов с пониженным содержанием фукозы.

[00116] Для длительного высокопродуктивного производства рекомбинантных белков можно получить клетки со стабильной экспрессией. Например, можно сконструировать клеточные линии, которые стабильно экспрессируют описанные в данном документе Fc-полипептиды. В конкретных вариантах осуществления в клетке, представленной в данном документе, стабильно экспрессируется первый Fc-полипептид и второй Fc-полипептид, которые связываются с образованием гетеродимерного белка, описанного в данном документе. В определенных вариантах осуществления в первой клетке, представленной в данном документе, стабильно экспрессируется первый Fc-полипептид, а во второй клетке, представленной в данном документе, стабильно экспрессируется второй Fc-полипептид. В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид, экспрессируемый первой клеткой, связывается со вторым Fc-полипептидом из второй клетки с образованием гетеродимерного белка, описанного в данном документе.

[00117] В определенных аспектах вместо использования векторов экспрессии, которые содержат вирусную точку инициации репликации, клетки-хозяева можно трансформировать с использованием ДНК под контролем соответствующих элементов контроля экспрессии (например, промоторных, энхансерных последовательностей, терминаторов транскрипции, сайтов

полиаденилирования и т. д.) и селективируемым маркером. После введения чужеродной ДНК/полинуклеотида сконструированные клетки можно оставить расти в течение 1–2 дней в обогащенной среде, а затем перенести их в селективную среду. Селективируемый маркер в рекомбинантной плазмиде придает устойчивость для селекции и позволяет клеткам стабильно интегрировать плазмиду в свои хромосомы и расти с образованием очагов, которые в свою очередь могут быть клонированы и размножены в клеточные линии. Данный способ можно успешно использовать для конструирования клеточных линий, в которых экспрессируются описанные в данном документе Fc-полипептиды. Такие сконструированные клеточные линии могут быть особенно применимы для скрининга и оценки композиций, которые прямо или опосредованно взаимодействуют с Fc-полипептидами.

[00118] Можно использовать ряд систем селекции, включая без ограничения гены тимидинкиназы вируса простого герпеса (публикация Wigler M et al., (1977) Cell 11(1): 223-32), гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (публикация Szybalska EH & Szybalski W (1962) PNAS 48(12): 2026-2034) и аденинфосфорибозилтрансферазы (Lowy I et al., (1980) Cell 22(3): 817-23) в tk(-), hgprr(-) или aprt(-) клетках соответственно, которые все включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Кроме того, устойчивость к антиметаболитам может быть использована в качестве основы для селекции следующих генов: dhfr, который придает устойчивость к метотрексату (Wigler M et al., (1980) PNAS 77(6): 3567-70; O'Hare K et al., (1981) PNAS 78: 1527-31); gpt, который придает устойчивость к микофеноловой кислоте (публикация Mulligan RC & Berg P (1981) PNAS 78(4): 2072-6); neo, который придает устойчивость к аминогликозидам G-418 (Wu GY & Wu CH (1991) Biotherapy 3: 87-95; Tolstoshev P (1993) Ann Rev Pharmacol Toxicol 32: 573-596; Mulligan RC (1993) Science 260: 926-932; and Morgan RA & Anderson WF (1993) Ann Rev Biochem 62: 191-217; Nabel GJ & Felgner PL (1993) Trends Biotechnol 11(5): 211-5); и hyg, который придает устойчивость к гигромицину (публикация Santerre RF et al., (1984) Gene 30(1-3): 147-56), все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Способы, широко известные в области технологии рекомбинантных ДНК, могут быть применены по стандартной методике для отбора требуемого рекомбинантного клона, и такие способы описаны, например, в Ausubel FM et al.,

(eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler M, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); и в главах 12 и 13, Dracopoli NC et al., (eds.), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colbère-Garapin F et al., (1981) *J Mol Biol* 150: 1-14, которые все включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00119] Уровни экспрессии белка можно увеличить путем амплификации вектора (обзор см. в справочнике Bebbington CR & Hentschel CCG, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987), который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Когда маркер в системе вектора, экспрессирующей Fc-полипептид, является амплифицируемым, повышение уровня ингибитора, присутствующего в культуре клетки-хозяина, будет увеличивать количество копий гена-маркера. Поскольку амплифицированная область связана с геном, кодирующим Fc-полипептид, продуцирование Fc-полипептида также будет повышаться (публикация Crouse GF et al., (1983) *Mol Cell Biol* 3: 257-66, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[00120] Клетку-хозяина можно одновременно трансфицировать двумя или более векторами экспрессии, описанными в данном документе, при этом первый вектор кодирует первый Fc-полипептид, а второй вектор кодирует второй Fc-полипептид. Два вектора могут содержать идентичные селектируемые маркеры, которые обеспечивают равную экспрессию первого и второго Fc-полипептидов. Клетки-хозяева можно одновременно трансфицировать разными количествами двух или более векторов экспрессии. Например, клетки-хозяева можно трансфицировать при любом из следующих соотношений первого вектора экспрессии и второго вектора экспрессии: приблизительно 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:12, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45 или 1:50.

[00121] В качестве альтернативы можно использовать один вектор, который кодирует и способен экспрессировать как первый, так и второй Fc-полипептиды гетеродимерного белка. Кодировующие последовательности для первого и второго Fc-полипептидов могут содержать кДНК или геномную ДНК. Вектор экспрессии может быть моноцистронным или мультицистронным. Мультицистронная

конструкция нуклеиновой кислоты может кодировать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше генов/нуклеотидных последовательностей или в диапазоне 2–5, 5–10 или 10–20 генов/нуклеотидных последовательностей. Например, бицистронная конструкция нуклеиновой кислоты может содержать в следующем порядке промотор, первый ген (например, первый Fc-полипептид гетеродимерного белка, описанного в данном документе) и второй ген (например, второй Fc-полипептид гетеродимерного белка, описанного в данном документе). В таком векторе экспрессии транскрипция обоих генов может управляться промотором, тогда как трансляция мРНК первого гена может осуществляться посредством кэп-зависимого сканирующего механизма, а трансляция мРНК второго гена может осуществляться посредством кэп-независимого механизма, например посредством IRES.

[00122] После получения описанного в данном документе гетеродимерного белка или Fc-полипептида путем рекомбинантной экспрессии его можно очистить с использованием любого метода, известного в данной области техники для очистки белка, например, при помощи хроматографии (например, ионообменной, аффинной и калибровочной колоночной хроматографией), центрифугирования, дифференциальной растворимости или с помощью любого другого стандартного метода очистки белков. Кроме того, для облегчения очистки гетеродимерные белки и Fc-полипептиды, описанные в данном документе, могут быть слиты с гетерологичными полипептидными последовательностями, описанными в данном документе, или в других отношениях известными в данной области техники.

[00123] В конкретных вариантах осуществления гетеродимерный белок или Fc-полипептид, описанные в данном документе, выделяют или очищают. Как правило, выделенный белок представляет собой белок, который по сути не содержит других белков. Например, в конкретном варианте осуществления препарат на основе гетеродимерного белка или Fc-полипептидов, описанный в данном документе, по сути не содержит клеточный материал и/или химические предшественники. Термин «по сути не содержит клеточный материал» включает препараты на основе белка, в которых белок отделен от клеточных компонентов клеток, из которых он выделен или рекомбинантно получен. Таким образом, белок, который по сути не содержит клеточный материал, включает препараты на основе белка, содержащие менее приблизительно 30%, 20%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% (на сухую массу)

гетерологичного белка (также называемого в данном документе «контаминирующим белком») и/или вариантов белка, например, различных посттрансляционно модифицированных форм белка или других разных вариантов белка (например, фрагментов белка). Если белок получают рекомбинантно, он также обычно по сути не содержит культуральную среду, т. е. культуральная среда составляет менее приблизительно 20%, 10%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% объема препарата белка. Если белок получают путем химического синтеза, он обычно по сути не содержит химические предшественники или другие химические вещества, т. е. он отделен от химических предшественников или других химических веществ, которые вовлечены в синтез белка. Соответственно, такие препараты на основе белка содержат менее приблизительно 30%, 20%, 10% или 5% (на сухую массу) химических предшественников или соединений, отличных от представляющего интерес белка. В конкретном варианте осуществления гетеродимерные белки и Fc-полипептиды, описанные в данном документе, выделяют или очищают.

[00124] Гетеродимерные белки и Fc-полипептиды, описанные в данном документе, можно получить посредством любого способа, известного в данной области техники для синтеза белков, например, путем химического синтеза или методами рекомбинантной экспрессии. В способах, описанных в данном документе, используют, если не указано иное, общепринятые методики молекулярной биологии, микробиологии, генетического анализа, рекомбинантной ДНК, органической химии, биохимии, ПЦР, синтеза и модификации олигонуклеотидов, гибридизации нуклеиновых кислот и смежных областей в данной области техники. Эти методики описаны, например, в ссылках, цитируемых в данном документе, и полностью объясняются в литературе. См., например, Maniatis T et al., (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J et al., (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J et al., (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987 и ежегодные обновления); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (1987 и ежегодные обновления) Gait (ed.) (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren B et al., (eds.)

(1999) Genome Analysis: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press,,
которые все включены в данный документ посредством ссылки во всей своей
полноте.

6. ПРИМЕРЫ

[00125] Эти примеры представлены в качестве иллюстрации, а не в
качестве ограничения.

6.1 Пример 1. Синтез и гетеродимеризация Fc-полипептидов

[00126] В данном примере описывается синтез и гетеродимеризация Fc-
полипептидов, специфичных для мишени 1 или мишени 2 (два разных антигена,
присутствующих на поверхности человеческих Т-клеток).

6.1.1 Синтез Fc-полипептидов

[00127] Двенадцать Fc-полипептидов (каждый предусматривает
полуантитело, специфичное либо к мишени 1, либо к мишени 2) экспрессировали в
клетках CHO и очищали посредством аффинной хроматографии с белком А (GE
Healthcare). Связывающая специфичность антигенсвязывающей части и
аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи для каждого
из двенадцати Fc-полипептидов описаны в таблице 3.

Таблица 3. Fc-полипептиды

Номер Fc- полипептида	Специфичность к антигену и мутация(-и) в Fc	SEQ ID NO последовательности константной области тяжелой цепи*
1	Мишень 1 T366W	22
2	Мишень 1 T366S/L368A/Y407V	30
3	Мишень 1 S239D/A330L/I332E/ T366W	24
4	Мишень 1 S239D/A330L/I332E/ T366S/L368A/Y407V	32
5	Мишень 1 S239D/	36

	T366S/L368A/Y407V	
6	Мишень 1 IgG1 дикого типа	14
7	Мишень 2 T366W	22
8	Мишень 2 T366S/L368A/Y407V	30
9	Мишень 2 S239D/A330L/I332E/ T366W	24
10	Мишень 2 S239D/A330L/I332E/ T366S/L368A/Y407V	32
11	Мишень 2 S239D/ T366S/L368A/Y407V	36
12	Мишень 2 IgG1 дикого типа	14

*Кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты для каждой из этих константных областей тяжелой цепи включает лизин на С-конце.

[00128] Измерили и сравнили уровни экспрессии белка для Fc-полипептида № 4, 5, 2, 10, 11 и 8. На фигуре 1 показано, что Fc-полипептиды № 4 и 10 (которые содержали как мутации S239D/A330L/I332E, так и мутации T366S/L368A/Y407V), экспрессировались с незначительными уровнями по сравнению с другими тестируемыми Fc-полипептидами.

6.1.2 Гетеродимеризация Fc-полипептидов

[00129] Fc-полипептиды, представленные в таблице 3, подвергали гетеродимеризации с образованием гетеродимерных белков, описанных в таблице 4. Если вкратце, первый и второй Fc-полипептиды, указанные в таблице 4, смешивали в эквимольных количествах в присутствии 50 мМ восстановителя (2-MEA) в течение по меньшей мере 2 часов для восстановления дисульфидных связей между тяжелыми цепями. Затем смеси Fc-полипептидов подвергали замене буфера на буфер для повторного окисления (10 мМ цитрата натрия, pH 6,0, 115 мМ NaCl) с использованием обессоливающих колонок PD-10 для удаления восстановителя и инкубировали при комнатной температуре в течение 24 часов для облегчения димеризации первого и второго Fc-полипептидов. Полученные смеси Fc-полипептидов затем подвергали замене буфера на буфер для хранения (10 мМ гистидина, pH 6 и 115 мМ NaCl). Чистоту и качество определяли с помощью SDS-

PAGE (электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия), а образование димера и процент гетеродимеризации оценивали с помощью абсолютной эксклюзионной хроматографии (ASEC).

Таблица 4. Гетеродимерные белки

Название	Первый Fc-полипептид	Второй Fc-полипептид
BA111	Fc-полипептид № 1	Fc-полипептид № 2
BA112	Fc-полипептид № 3	Fc-полипептид № 2
BA113	Fc-полипептид № 3	Fc-полипептид № 5
BA114	Fc-полипептид № 3	Fc-полипептид № 4
BA115	Fc-полипептид № 7	Fc-полипептид № 8
BA116	Fc-полипептид № 9	Fc-полипептид № 8
BA117	Fc-полипептид № 9	Fc-полипептид № 11
BA118	Fc-полипептид № 9	Fc-полипептид № 10

6.1.3 Термостабильность

[00130] Оценивали термостабильность гетеродимерных белков BA111, BA112, BA113, BA114, BA115, BA116, BA117 и BA118. 1 мкл флуоресцентного красителя Sypro Orange (конечная концентрация Sypro 5-кратная) добавляли к 4 мкг белка, разведенного в PBS. Флуоресценцию Sypro Orange анализировали на термоциклере (CFX96 Real-Time System C1000 PCR Detection System, Biorad) с линейным изменением температуры, начиная с 10°C до 95°C, а тепловые сдвиги белков анализировали с помощью программного обеспечения CFX Maestro. Гистограммы были созданы в Prism.

[00131] На фигуре 2А показана температура плавления для гетеродимерных белков к мишени 1: BA111, BA112, BA113 и BA114. Температура плавления у BA114 ниже, чем у BA111, BA112 или BA113.

[00132] На фигуре 2В показана температура плавления для гетеродимерных белков к мишени 2: BA115, BA116, BA117 и BA118. Температура плавления у BA118 ниже, чем у BA115, BA116 или BA117.

6.2 Пример 2. Связывание мишени

[00133] Этот пример демонстрирует способность гетеродимерных белков, представленных в таблице 4, связываться с их предполагаемыми мишенями.

6.2.1 Мишень 1

[00134] Оценивали способность гетеродимерных белков BA111, BA112, BA113, BA114, гомодимерного белка BA119 (IgG₁ дикого типа) и изотипического контрольного антитела IgG₁ связываться с мишенью 1.

[00135] Если вкратце, замороженную аликвоту клеток Jurkat, сконструированных для экспрессии человеческой мишени 1, размораживали при температуре 37°C и культивировали в течение ночи в среде RPMI с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) при 37°C и 5% CO₂. Клетки подсчитывали и оценивали их жизнеспособность с использованием аппарата Muse (Luminex Corp.) путем смешивания аликвоты клеток объемом 20 мкл с 380 мкл красителя для определения жизнеспособности. Затем клетки осаждали центрифугированием при 1500 об/мин в течение пяти минут и ресуспендировали до конечной концентрации 1×10^6 клеток/мл в 1-кратном фосфатно-буферном солевом растворе (PBS) с добавлением 2% FBS (буфера для FACS). Клетки высевали в 96-луночный планшет для культивирования тканей с U-образным дном при плотности 1×10^5 клеток на лунку и дважды промывали буфером для FACS.

[00136] Гетеродимерные белки последовательно разбавляли 1:10 в буфере для FACS с получением в общей сложности 8 рабочих разведений в диапазоне от 50 мкг/мл до 0,000005 мкг/мл. Клетки ресуспендировали в 50 мкл раствора гетеродимерного белка и инкубировали в течение 30 мин при температуре 4°C.

[00137] Для выявления связывания гетеродимерных белков клетки дважды

промывали холодным буфером для FACS и ресуспендировали в буфере для FACS, содержащем меченное флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) вторичное козье антитело к IgG (H+L) человека в конечном разведении 1:200 и раствор для окрашивания живой/мертвый в конечном разведении 1:1000. Затем клетки инкубировали в течение 30 минут при температуре 4°C, дважды промывали холодным буфером для FACS и анализировали посредством проточной цитометрии (с использованием проточного цитометра BD LSR Fortessa). Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (версия 10, FLOWJO) путем последовательного гейтирования FSC-A против SSC-A, SSC-H против SSC-A и SSC-A против живой/мертвый. Рассчитывали средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) для окрашивания FITC и нанесли данные на график с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (версия 7, GraphPad Software Inc.).

[00138] На фигуре 3 показано, что BA111, BA112, BA113, BA114 и BA119 продемонстрировали эффективное и сопоставимое связывание с клетками, экспрессирующими мишень 1.

6.2.2 Мишень 2

[00139] Оценивали способность гетеродимерных белков BA115, BA116, BA117, BA118, гомодимерного белка BA120 (IgG₁ дикого типа) и изотипического контрольного антитела IgG₁ связываться с мишенью 2.

[00140] Если вкратце, замороженную аликвоту клеток CHO, сконструированных для экспрессии мишени 2, размораживали при температуре 37°C и культивировали в течение ночи в среде F-12 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) при 37°C и 5% CO₂. Клетки подсчитывали и оценивали их жизнеспособность на приборе Vi-XCell. Затем клетки осаждали центрифугированием при 1500 об/мин в течение пяти минут и ресуспендировали до конечной концентрации 1×10^6 клеток/мл в 1-кратном фосфатно-буферном солевом растворе (PBS) с добавлением 2% FBS (буфера для FACS). Клетки высевали в 96-луночный планшет для культивирования тканей с U-образным дном при плотности 1×10^5 клеток на лунку и дважды промывали буфером для FACS.

[00141] Гетеродимерные белки последовательно разбавляли 1:3 в буфере для FACS с получением в общей сложности 8 рабочих разведений в диапазоне от 30

мкг/мл до 0,013717 мкг/мл. Клетки ресуспендировали в 50 мкл раствора гетеродимерного белка и инкубировали в течение 30 мин при температуре 4°C.

[00142] Для выявления связывания гетеродимерных белков клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и ресуспендировали в буфере для FACS, содержащем меченное флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) вторичное козье антитело к IgG (H+L) человека в конечном разведении 1:200 и раствор для окрашивания живой/мертвый в конечном разведении 1:1000. Затем клетки инкубировали в течение 30 минут при температуре 4°C, дважды промывали холодным буфером для FACS и анализировали посредством проточной цитометрии (с использованием проточного цитометра BD LSR Fortessa). Данные проанализировали с использованием программного обеспечения FlowJo путем последовательного гейтирования FSC-A против SSC-A, SSC-H против SSC-A и SSC-A против живой/мертвый. Рассчитывали средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) для окрашивания FITC и нанесли данные на график с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

[00143] На фигуре 4 показано, что BA115, BA116, BA117, BA118 и BA120 продемонстрировали эффективное и сопоставимое связывание с клетками, экспрессирующими мишень 2.

6.3 Пример 3. Блокирование мишени

[00144] Этот пример демонстрирует способность гетеродимерных белков, представленных в таблице 4, блокировать передачу сигналов в клетках, экспрессирующих их предполагаемую мишень.

6.3.1 Мишень 1

[00145] Способность гетеродимерных белков BA111, BA112, BA113, BA114, гомодимерного белка BA119 (IgG₁ дикого типа) и изотипического контрольного антитела IgG₁ блокировать передачу сигнала путем связывания мишени 1 оценивали с использованием репортерного анализа на клетках Jurkat..

[00146] Если вкратце, линию человеческих Т-клеток (Jurkat), сконструированную для экспрессии человеческой мишени 1 с репортерным геном люциферазы под управлением нативного промотора, который может отвечать как на

активацию TCR, так и на ингибирующую передачу сигналов корецептора, который подавляет активацию (Promega), высевали в 96-луночный белый планшет с плоским дном в соответствии с протоколом производителя и обрабатывали с подбором дозы BA111, BA112, BA113, BA114, BA119 и изотипического контрольного антитела IgG₁, последовательно разбавленных 1 к 2,5 в культуральной среде от 50 мкг/мл до 0,015 мкг/мл. Для оценки функциональной активности указанных гетеродимерных белков клетки СНО-K1, сконструированные для экспрессии природного лиганда мишени 1, и сконструированный белок клеточной поверхности, предназначенный для активации комплекса Т-клеточного рецептора (TCR) антиген-независимым образом, совместно культивировали с обработанной гетеродимерным белком репортерной клеточной линией Jurkat в течение 6 часов при температуре 37°C и 5% CO₂. Для оценки способности гетеродимерных белков блокировать взаимодействие мишени 1 с ее природным лигандом и усиливать активность гена активации Т-клеток экспрессию люциферазы количественно определяли с использованием реагента Bio-Glo™ и люминометра Envision для считывания планшетов.

[00147] На фигуре 5 показано, что совместное культивирование клеточных линий привело к взаимодействию ингибирующего корецептора мишени 1 (экспрессируемого на клетках Jurkat) с его природными лигандами CD80 и CD86 (экспрессируемыми на клетках Raji), что ингибировало активацию Т-клеток, о чем свидетельствует отсутствие экспрессии люциферазы. Это ингибирование ослаблялось при добавлении BA111, BA112, BA113, BA114 или гомодимерного белка BA119 в возрастающих концентрациях. BA111, BA112, BA113, BA114 и BA119 были функционально сопоставимы по усилению активации Т-клеток, определяемому по активности репортерного гена, находящегося под контролем промотора IL-2.

6.3.2 Мишень 2

[00148] Способность гетеродимерных белков BA115, BA116, BA117, BA118, гомодимерного белка BA120 (IgG₁ дикого типа) и изотипического контрольного антитела IgG₁ блокировать передачу сигнала путем связывания мишени 2 оценивали с использованием репортерного анализа на клетках Jurkat.

[00149] Если вкратце, линию человеческих Т-клеток (Jurkat), которая эндогенно экспрессирует ингибирующий корецептор мишени 2, сконструировали для

конститутивной экспрессии мишени 2 клеточной поверхности и репортерного гена люциферазы под управлением промотора IL-2 (Promega). Клетки высевали в 96-луночный плоскодонный белый планшет в соответствии с протоколом производителя и обрабатывали с подбором дозы указанных гетеродимерных белков к мишени 2 или изотипического контрольного антитела IgG₁. Гетеродимерные белки последовательно разбавляли 1:2,5 в культуральной среде с получением концентраций в диапазоне от 50 мкг/мл до 0,015 мкг/мл. Линию антигенпрезентирующих клеток (Raji), которая эндогенно экспрессирует природные лиганды мишени 2 и была сконструирована для экспрессии запатентованного активатора Т-клеток, приготовили в соответствии с инструкциями производителя и культивировали совместно с обработанными гетеродимерным белком клетками Jurkat в течение 6 часов при температуре 37°C и 5% CO₂. Для оценки способности гетеродимерных белков блокировать взаимодействия с мишенью 2 и повышать активность репортерного гена, находящегося под контролем промотора IL-2, экспрессию люциферазы количественно определяли с использованием реагента Bio-Glo™ и люминометра Envision для чтения планшетов.

[00150] На фигуре 6 показано, что совместное культивирование клеточных линий привело к взаимодействию ингибирующего корцептора мишени 2 (экспрессируемого на клетках Jurkat) с его природными лигандами (экспрессируемыми на клетках Raji), что ингибировало активацию Т-клеток, о чем свидетельствует отсутствие экспрессии люциферазы. Это ингибирование ослаблялось при добавлении BA115, BA116, BA117, BA118 или гомодимерного белка BA120 в возрастающих концентрациях. BA115, BA116, BA117, BA118 и BA120 были функционально сопоставимы по усилению активации Т-клеток, определяемому по активности репортерного гена, находящегося под контролем промотора IL-2.

6.4 Пример 4. Анализ со стимуляцией с использованием SEA

[00151] Этот пример демонстрирует способность гетеродимерных белков инициировать секрецию IL-2 у SEA-стимулированных клеток PBMC.

6.4.1 Мишень 1

[00152] Исследовали способность гетеродимерных белков, специфичных для мишени 1, инициировать секрецию IL-2 у SEA-стимулированных клеток PBMC.

[00153] Если вкратце, 5-кратный концентрированный промежуточный раствор гетеродимерного белка, достаточный для трех повторов на одного донора, готовили в круглодонных пробирках объемом 1,2 мл. Сначала в среде R10 готовили по 420 мкл при концентрации 500 мкг/мл каждого гетеродимерного белка. Затем гетеродимерные белки последовательно разбавляли 1 к 10 с получением в общей сложности 8 разведений, а затем добавляли по 20 мкл смеси гетеродимерных белков в соответствующие лунки 96-луночного круглодонного планшета. Замороженные аликвоты РВМС человека извлекали из жидкого азота и немедленно оттаивали в воде с температурой 37°C. Клетки переносили в 9 мл предварительно подогретой среды R10 и немедленно центрифугировали при 2000 об/мин в течение двух минут. Затем подсчитывали клетки и оценивали их жизнеспособность. Клетки центрифугировали при 2000 об/мин в течение двух минут и ресуспендировали.

[00154] Промежуточную концентрацию смеси SEA получали путем разбавления 10 мкл раствора SEA с концентрацией 10 мкг/мл в 90 мкл среды R10 с получением промежуточной концентрации 1 мкг/мл. Для стимуляции клеток к 28 мл клеток добавляли 35 мкл промежуточной смеси SEA с концентрацией 1 мкг/мл. 80 мкл клеток и смеси SEA добавляли в соответствующие лунки и инкубировали во влажной камере при температуре 37°C и 5% CO₂ в течение четырех дней. В общей сложности использовали $0,1 \times 10^6$ клеток/лунка и SEA в конечной концентрации 1 нг/мл.

[00155] После четырех дней инкубации планшеты вынимали из инкубатора, осторожно встряхивали вручную, а затем центрифугировали в течение двух минут при 2000 об/мин. 5 мкл супернатанта переносили в 384-луночный планшет AlphaLISA (Perkin Elmer) для анализа цитокинов. Наборы AlphaLISA использовали для измерения концентрации IL-2 в соответствии с инструкциями производителя. Если вкратце, буфер для анализа готовили путем добавления 2,5 мл 10-кратного буфера для иммуноанализа AlphaLISA к 22,5 мл воды. Аналит человеческого IL-2 использовали для приготовления стандартного разведения в соответствии с инструкциями производителя. Смесь 1,6-кратного раствора акцепторных гранул AlphaLISA к IL-2 и смеси биотинилированных антител к IL-2 готовили в буфере для анализа. В каждую лунку добавляли по 8 мкл и инкубировали в темноте при комнатной температуре, вращая со скоростью 500 об/мин в течение 90

минут. В буфере для анализа готовили 2,3-кратную промежуточную смесь донорных гранул стрептавидина. В каждую лунку добавляли по 10 мкл и инкубировали в темноте при комнатной температуре, вращая со скоростью 500 об/мин в течение 20 минут. Планшеты AlphaLISA кратковременно центрифугировали при 2000 об/мин. Относительные световые единицы (RLU) измеряли с использованием протокола AlphaScreen на устройстве для считывания планшетов EnVision.

[00156] На фигурах 7А – 7Р показано, что ВА113 значительно усиливал секрецию IL-2 дозозависимым образом, что было сопоставимо с референтным гомодимерным белком 2, также специфичным для мишени 1. ВА113 продемонстрировал более высокую функциональную активность по сравнению с ВА112 и ВА111. ВА111 не индуцировал значимых уровней секреции IL-2 по сравнению с клетками, обработанными гомодимерным изотипическим контрольным белком, который содержит мутации S239D/A330L/I332E («усиленный Fc») и использовался в качестве изотипического контроля. ВА114 продемонстрировал выраженную сниженную активность в отношении усиления секреции IL-2 по сравнению с ВА113. Результаты, представленные на фигурах 7А – 7Р, были получены с использованием РВМС от 3 разных доноров: донора 1 (фигуры 7А – 7D и фигуры 7I – 7L), донора 2 (фигуры 7Е – 7Н) и донора 3 (фигуры 7М – 7Р).

6.4.2 Мишень 2

[00157] Исследовали способность гетеродимерных белков, специфичных для мишени 2, инициировать секрецию IL-2 у SEA-стимулированных клеток РВМС.

[00158] Эксперименты проводили согласно описанному в примере 6.4.1 выше с использованием ВА115, ВА116, ВА117, ВА118 и референтного гомодимерного белка 1. В качестве изотипического контроля использовали гомодимерный изотипический белок, который содержит мутации S239D/A330L/I332E («усиленный Fc»).

[00159] На фигурах 8А – 8Х показано, что ВА117 значительно усиливал секрецию IL-2 дозозависимым образом и демонстрировал более высокую функциональную активность по сравнению с ВА116, и ВА115, и референтным гомодимерным белком 1, также специфичным для мишени 2. ВА115 продемонстрировал значительно сниженную активность по сравнению с ВА117,

BA118 или BA116. Варианты BA115 и BA118 проявляли сопоставимую функциональную активность в отношении усиления секреции IL-2 у доноров SEA-стимулированных клеток PBMC.

6.5 Пример 5. Связывание Fc

6.5.1 Связывание FcγRIIIA (CD16)

6.5.1.1 Мишень 1

[00160] Способность BA111, BA112, BA113 и BA114 связывать FcγRIIIA оценивали посредством анализа связывания клеток.

[00161] Если вкратце, клетки CHO, экспрессирующие hFcγRIIIA (V/V) или hFcγRIIIA (F/F), оттаивали и ресуспендировали в 5 мл буфера FACS (DPBS, BSA 0,5%, азид 0,05%) при плотности клеток 4×10^6 клеток/мл. Клетки распределяли в 96-луночный планшет для культур тканей с U-образным дном при плотности 2×10^5 клеток/лунка, а затем инкубировали в течение 45 минут при температуре 4°C с последовательными разведениями BA111, BA112, BA113 и BA114 в концентрациях от 60 мкг/мл до 7 нг/мл в буфере для FACS. Для окрашивания антител клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и ресуспендировали в буфере для FACS, содержащем козье антитело к человеческому IgG-PE (F(ab)2 к Fc) (JIR, кат. № 109-116-098) в разведении 1:800. После 45-минутной инкубации при температуре 4°C клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и анализировали посредством проточной цитометрии (с использованием проточного цитометра BD LSR Fortessa). Данные проанализировали с использованием программного обеспечения FlowJo путем последовательного гейтирования FSC-A против SSC-A, SSC-H против SSC-A и SSC-A против PE. Рассчитывали значения среднего геометрического интенсивности флуоресценции (gMFI) и данные нанесли на график с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Данные взяты из трех отдельных экспериментов; планка погрешности представляет собой стандартную погрешность среднего.

[00162] На фигурах 9A и 9B показано, что BA112, BA113 и BA114 связываются с FcγRIIIA V/V (фигура 9A) и F/F (фигура 9B), экспрессируемыми на клетках CHO. BA113 демонстрирует усиленное связывание FcγRIIIA V/V (фигура 9A) и F/F (фигура 9B) по сравнению с BA111.

6.5.1.2 Мишень 2

[00163] Способность BA115, BA116, BA117 и BA118 связывать FcγRIIIA оценивали посредством анализа связывания клеток.

[00164] Эксперимент проводили согласно описанному в разделе 6.5.1.1 за исключением того, что использовали гетеродимерные белки BA115, BA116, BA117 и BA118 в концентрациях от 60 мкг/мл до 7 нг/мл. Данные взяты из трех экспериментов; планка погрешности представляет собой стандартную погрешность среднего.

[00165] На фигурах 10A и 10B показано, что BA116, BA117 и BA118 связываются с FcγRIIIA V/V (фигура 10A) и F/F (фигура 10B), экспрессируемыми на клетках СНО. BA117 демонстрирует усиленное связывание с FcγRIIIA V/V (фигура 10A) и F/F (фигура 10B) по сравнению с BA115.

6.5.2 Другие Fc-рецепторы

[00166] Способность BA112, BA113, BA114, BA115, BA116, BA117 и BA118 связываться с FcγRI, FcγRIIa H/H, FcγRIIa R/R и FcγRIIb также оценивали посредством анализов связывания клеток, и каких-либо значимых отличий не наблюдалось.

6.5.3 Связывание FcγRIIIA (CD16) для дополнительных гетеродимерных белков

[00167] В данном примере описывается синтез, гетеродимеризация и связывание с Fc-рецептором дополнительных Fc-полипептидов, специфичных в отношении мишени 1 или мишени 2 (два разных антигена, присутствующих на поверхности Т-клеток человека).

[00168] Дополнительные Fc-полипептиды (каждый предусматривает полуантитело, специфичное либо к мишени 1, либо к мишени 2) экспрессировали в клетках СНО и очищали посредством аффинной хроматографии с белком А (GE Healthcare). Связывающая специфичность антигенсвязывающей части и аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи для каждого из двенадцати Fc-полипептидов описаны в таблице 5.

Таблица 5. Fc-полипептиды

Номер Fc-полипептида	Специфичность к антигену и мутация(-и) в Fc	SEQ ID NO последовательности константной области тяжелой цепи*
13	Мишень 1 T366W/S239D/A330L	68
14	Мишень 1 T366W/S239D/I332E	26
15	Мишень 1 T366W/A330L/I332E	75
16	Мишень 1 T366W/S239D	28
17	Мишень 1 T366W/A330L	69
18	Мишень 1 T366W/I332E	70
19	Мишень 1 T366S/L368A/Y407V/S239D/A330L	71
20	Мишень 1 T366S/L368A/Y407V/A330L/I332E	72
21	Мишень 1 T366S/L368A/Y407V/S239D/I332E	34
22	Мишень 1 T366S/L368A/Y407V/A330L	73
23	Мишень 1 T366S/L368A/Y407V/I332E	74
24	Мишень 2 T366W/S239D/A330L	68
25	Мишень 2 T366W/S239D/I332E	26
26	Мишень 2 T366W/S239D	28
27	Мишень 2 T366W/A330L	69
28	Мишень 2 T366W/I332E	70
29	Мишень 2 T366S/L368A/Y407V/S239D/A330L	71
30	Мишень 2 T366S/L368A/Y407V/A330L/I332E	72
31	Мишень 2	34

	T366S/L368A/Y407V/S239D/I332E	
32	Мишень 2 T366S/L368A/Y407V/A330L	73
33	Мишень 2 T366S/L368A/Y407V/I332E	74

[00169] Полипептиды Fc, представленные в таблицах 3 и/или 5, подвергали гетеродимеризации с образованием моноспецифических гетеродимерных белков, описанных в таблице 6. Гетеродимеризацию выполняли так, как это описано в примере 6.1.2.

Таблица 6. Гетеродимерные белки

Название	Первый Fc-полипептид	Второй Fc-полипептид
BA115	Fc-полипептид № 7	Fc-полипептид № 8
BA116	Fc-полипептид № 9	Fc-полипептид № 8
BA161	Fc-полипептид № 24	Fc-полипептид № 8
BA162	Fc-полипептид № 25	Fc-полипептид № 8
BA163	Fc-полипептид № 26	Fc-полипептид № 8
BA164	Fc-полипептид № 27	Fc-полипептид № 8
BA165	Fc-полипептид № 28	Fc-полипептид № 8
BA166	Fc-полипептид № 7	Fc-полипептид № 29
BA167	Fc-полипептид № 9	Fc-полипептид № 29

BA168	Fc-полипептид № 24	Fc-полипептид № 29
BA169	Fc-полипептид № 25	Fc-полипептид № 29
BA170	Fc-полипептид № 26	Fc-полипептид № 29
BA171	Fc-полипептид № 27	Fc-полипептид № 29
BA172	Fc-полипептид № 28	Fc-полипептид № 29
BA173	Fc-полипептид № 7	Fc-полипептид № 30
BA174	Fc-полипептид № 9	Fc-полипептид № 30
BA175	Fc-полипептид № 24	Fc-полипептид № 30
BA176	Fc-полипептид № 25	Fc-полипептид № 30
BA177	Fc-полипептид № 26	Fc-полипептид № 30
BA178	Fc-полипептид № 27	Fc-полипептид № 30
BA179	Fc-полипептид № 28	Fc-полипептид № 30
BA180	Fc-полипептид № 7	Fc-полипептид № 31
BA181	Fc-полипептид № 9	Fc-полипептид № 31
BA182	Fc-полипептид № 24	Fc-полипептид № 31
BA183	Fc-полипептид № 25	Fc-полипептид № 31
BA184	Fc-полипептид № 26	Fc-полипептид № 31

BA185	Fc-полипептид № 27	Fc-полипептид № 31
BA186	Fc-полипептид № 28	Fc-полипептид № 31
BA187	Fc-полипептид № 7	Fc-полипептид № 11
BA117	Fc-полипептид № 9	Fc-полипептид № 11
BA188	Fc-полипептид № 24	Fc-полипептид № 11
BA189	Fc-полипептид № 25	Fc-полипептид № 11
BA190	Fc-полипептид № 26	Fc-полипептид № 11
BA191	Fc-полипептид № 27	Fc-полипептид № 11
BA192	Fc-полипептид № 28	Fc-полипептид № 11
BA193	Fc-полипептид № 7	Fc-полипептид № 32
BA194	Fc-полипептид № 9	Fc-полипептид № 32
BA195	Fc-полипептид № 24	Fc-полипептид № 32
BA196	Fc-полипептид № 25	Fc-полипептид № 32
BA197	Fc-полипептид № 26	Fc-полипептид № 32
BA198	Fc-полипептид № 27	Fc-полипептид № 32
BA199	Fc-полипептид № 28	Fc-полипептид № 32
BA200	Fc-полипептид № 7	Fc-полипептид № 33

BA201	Fc-полипептид № 9	Fc-полипептид № 33
BA202	Fc-полипептид № 24	Fc-полипептид № 33
BA203	Fc-полипептид № 25	Fc-полипептид № 33
BA204	Fc-полипептид № 26	Fc-полипептид № 33
BA205	Fc-полипептид № 27	Fc-полипептид № 33
BA206	Fc-полипептид № 28	Fc-полипептид № 33
BA111	Fc-полипептид № 1	Fc-полипептид № 2
BA112	Fc-полипептид № 3	Fc-полипептид № 2
BA207	Fc-полипептид № 13	Fc-полипептид № 2
BA208	Fc-полипептид № 14	Fc-полипептид № 2
BA209	Fc-полипептид № 15	Fc-полипептид № 2
BA210	Fc-полипептид № 16	Fc-полипептид № 2
BA211	Fc-полипептид № 17	Fc-полипептид № 2
BA212	Fc-полипептид № 18	Fc-полипептид № 2
BA213	Fc-полипептид № 1	Fc-полипептид № 19
BA214	Fc-полипептид № 3	Fc-полипептид № 19
BA215	Fc-полипептид № 13	Fc-полипептид № 19

BA216	Fc-полипептид № 14	Fc-полипептид № 19
BA217	Fc-полипептид № 15	Fc-полипептид № 19
BA218	Fc-полипептид № 16	Fc-полипептид № 19
BA219	Fc-полипептид № 17	Fc-полипептид № 19
BA220	Fc-полипептид № 18	Fc-полипептид № 19
BA221	Fc-полипептид № 1	Fc-полипептид № 20
BA222	Fc-полипептид № 3	Fc-полипептид № 20
BA223	Fc-полипептид № 13	Fc-полипептид № 20
BA224	Fc-полипептид № 14	Fc-полипептид № 20
BA225	Fc-полипептид № 15	Fc-полипептид № 20
BA226	Fc-полипептид № 16	Fc-полипептид № 20
BA227	Fc-полипептид № 17	Fc-полипептид № 20
BA228	Fc-полипептид № 18	Fc-полипептид № 20
BA229	Fc-полипептид № 1	Fc-полипептид № 21
BA230	Fc-полипептид № 3	Fc-полипептид № 21
BA231	Fc-полипептид № 13	Fc-полипептид № 21
BA232	Fc-полипептид № 14	Fc-полипептид № 21

BA233	Fc-полипептид № 15	Fc-полипептид № 21
BA234	Fc-полипептид № 16	Fc-полипептид № 21
BA235	Fc-полипептид № 17	Fc-полипептид № 21
BA236	Fc-полипептид № 18	Fc-полипептид № 21
BA237	Fc-полипептид № 1	Fc-полипептид № 5
BA113	Fc-полипептид № 3	Fc-полипептид № 5
BA238	Fc-полипептид № 13	Fc-полипептид № 5
BA239	Fc-полипептид № 14	Fc-полипептид № 5
BA240	Fc-полипептид № 15	Fc-полипептид № 5
BA241	Fc-полипептид № 16	Fc-полипептид № 5
BA242	Fc-полипептид № 17	Fc-полипептид № 5
BA243	Fc-полипептид № 18	Fc-полипептид № 5
BA244	Fc-полипептид № 1	Fc-полипептид № 22
BA245	Fc-полипептид № 3	Fc-полипептид № 22
BA246	Fc-полипептид № 13	Fc-полипептид № 22
BA247	Fc-полипептид № 14	Fc-полипептид № 22
BA248	Fc-полипептид № 15	Fc-полипептид № 22

BA249	Fc-полипептид № 16	Fc-полипептид № 22
BA250	Fc-полипептид № 17	Fc-полипептид № 22
BA251	Fc-полипептид № 18	Fc-полипептид № 22
BA252	Fc-полипептид № 1	Fc-полипептид № 23
BA253	Fc-полипептид № 3	Fc-полипептид № 23
BA254	Fc-полипептид № 13	Fc-полипептид № 23
BA255	Fc-полипептид № 14	Fc-полипептид № 23
BA256	Fc-полипептид № 15	Fc-полипептид № 23
BA257	Fc-полипептид № 16	Fc-полипептид № 23
BA258	Fc-полипептид № 17	Fc-полипептид № 23
BA259	Fc-полипептид № 18	Fc-полипептид № 23

[00170] Способность гетеродимерных белков из таблицы 6 связывать Fc γ RIIA F/F оценивали с использованием анализа связывания клеток, описанного в примере 6.5.1, за исключением того, что детектирующее антитело, используемое для оценки гетеродимерных белков к мишени 1, показанных на фигуре 11 и в таблице 7, представляло собой козье антитело к человеческому IgG-Alexa Fluor 488, специфичное к Fc γ -фрагменту (JIR, кат. № 109-546-098). Диапазон разведения, использованный как для фигуры 11, так и для фигуры 12, составлял 100 мкг/мл – 0 мкг/мл с шагом разведения 1:4. В каждом случае для сравнения использовали референтный гомодимерный белок, содержащий мутации S239D/A330L/I332E («усиленный Fc»).

[00171] Способность гетеродимерных белков к мишени 1 с различными Fc-полипептидами связываться с клетками CHO, экспрессирующими FcγRIIIA F/F человека на клеточной поверхности, показана на фигурах 11A – 11G. Уровень связывания гетеродимерного белка с клетками, оцениваемый по геометрическому среднему значению интенсивности флуоресценции (MFI), наносили на график в зависимости от концентрации гетеродимерного белка, инкубированного с клетками. Площадь под кривой для каждого гетеродимерного белка представлена в таблице 7.

[00172] Способность гетеродимерных белков к мишени 2 с различными Fc-полипептидами связываться с клетками CHO, экспрессирующими FcγRIIIA F/F человека на клеточной поверхности, показана на фигурах 12A – 12G. Уровень связывания гетеродимерного белка с клетками, оцениваемый по геометрическому среднему значению интенсивности флуоресценции (MFI), наносили на график в зависимости от концентрации гетеродимерного белка, инкубированного с клетками. Площадь под кривой для каждого гетеродимерного белка представлена в таблице 8.

Таблица 7. Площадь под кривой для гетеродимерных белков, представленных на фигурах 11A – 11G

Название	AUC
Референтный гомодимерный белок 3	400560
BA222	482384
BA214	480264
BA230	479341
BA232	440787
BA113	434339
BA224	341586
BA255	289244
BA245	276263

BA233	270566
BA226	249901
BA239	248715
BA216	248277
BA240	246156
BA217	242282
BA223	238873
BA253	236702
BA231	229864
BA236	224726
BA234	205394
BA254	196874
BA220	193500
BA257	188615
BA243	173798
BA215	169206
BA218	164197
BA225	155132
BA228	153773
BA256	147779
BA247	140591
BA238	139565
BA259	135178
BA221	129190
BA248	128792
BA241	109967

BA213	97090
BA235	95446
BA251	88508
BA227	84590
BA246	76963
BA249	69589
BA219	66111
BA258	60553
BA242	49501
BA229	48590
BA237	40479
BA252	28796
BA244	26352
BA111	22945
BA250	17687
BA209	12160
BA112	11542
BA208	8967
BA211	8941
BA207	8588
BA212	8440
BA210	8416

Таблица 8. Площадь под кривой для гетеродимерных белков, представленных на фигурах 12A – 12G

Название	AUC
----------	-----

Референтный гомодимерный белок 4	92261
BA181	409269
BA183	363045
BA201	298944
BA174	229726
BA186	226029
BA203	221615
BA182	213536
BA184	201835
BA117	201821
BA176	175408
BA167	175293
BA189	173119
BA169	163892
BA175	138038
BA204	136837
BA177	131142
BA172	128775
BA202	123520
BA168	110262
BA188	109496
BA170	100200
BA179	98624
BA180	90331
BA192	89857

BA206	83706
BA116	79878
BA190	78765
BA200	63320
BA185	63295
BA173	55475
BA162	50986
BA194	49928
BA165	46970
BA178	46437
BA163	41201
BA161	38733
BA196	37758
BA171	37697
BA187	31952
BA166	31226
BA205	30148
BA191	27189
BA199	18921
BA115	14042
BA195	12935
BA197	12766
BA164	11045
BA193	3647
BA198	3474

*

*

*

[00173] Объем настоящего изобретения не следует ограничивать конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе. В действительности различные модификации, раскрытые в данном документе в дополнение к описанным в данном документе, станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания и сопровождающих фигур. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

[00174] Все ссылки (например, публикации или патенты или заявки на патент), процитированные в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная ссылка (например, публикация, или патент, или заявка на патент) была специально и отдельно указана для включения посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей. Другие варианты осуществления находятся в пределах следующих пунктов формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гетеродимерный белок, содержащий первый Fc-полипептид и второй Fc-полипептид, где:

а) первый Fc-полипептид содержит аспартат, глутамат и триптофан в положениях аминокислот 239, 332 и 366 соответственно; и

б) второй Fc-полипептид содержит аспартат, серин, аланин и валин в положениях аминокислот 239, 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит глутамат в положении аминокислоты 332,

при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с EU-индексом.

2. Гетеродимерный белок по п. 1, где первый Fc-полипептид дополнительно содержит лейцин в положении аминокислоты 330, при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с EU-индексом.

3. Гетеродимерный белок по п. 1 или п. 2, где второй Fc-полипептид не содержит лейцин в положении аминокислоты 330, при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с EU-индексом.

4. Гетеродимерный белок по любому из пп. 1—3, где первый Fc-полипептид содержит первый антигенсвязывающий фрагмент, и/или второй Fc-полипептид содержит второй антигенсвязывающий фрагмент.

5. Гетеродимерный белок по п. 4, где первый и/или второй антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный домен антитела, внеклеточный домен рецептора клеточной поверхности, растворимый T-клеточный рецептор или лиганд.

6. Гетеродимерный белок по п. 5, где первый и/или второй антигенсвязывающий фрагмент содержит VH, VL, VHH, пару VH/VL, scFv, диантитело и/или Fab.

7. Гетеродимерный белок по п. 5, где рецептор клеточной поверхности представляет собой рецептор суперсемейства фактора некроза опухоли, рецептор фактора роста эндотелия сосудов или рецептор трансформирующего фактора роста.

8. Гетеродимерный белок по п. 5, где лиганд представляет собой гормон или фактор роста.
9. Гетеродимерный белок по любому из пп. 4—8, где первый и второй антигенсвязывающие фрагменты специфически связываются с одними и теми же или разными молекулами-мишенями.
10. Гетеродимерный белок по любому из пп. 1—9, где первый и/или второй Fc-полипептид содержит домен CH1, шарнирную область, домен CH2 и/или домен CH3 из человеческого IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ или IgA₂.
11. Гетеродимерный белок по п. 10, где первый и/или второй Fc-полипептид содержит тяжелую цепь антитела.
12. Гетеродимерный белок по п. 11, где в тяжелой цепи антитела отсутствует домен CH1 и/или часть шарнирной области.
13. Гетеродимерный белок по п. 11, где тяжелая цепь антитела представляет собой тяжелую цепь полноразмерного антитела.
14. Гетеродимерный белок по любому из пп. 11—13, где тяжелая цепь антитела представляет собой тяжелую цепь из человеческого IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ или IgA₂.
15. Гетеродимерный белок по любому из пп. 11—14, где первый и/или второй Fc-полипептид дополнительно содержит легкую цепь антитела.
16. Гетеродимерный белок по п. 15, где легкая цепь антитела представляет собой человеческую легкую каппа- или лямбда-цепь.
17. Гетеродимерный белок по любому из пп. 1—6 и пп. 9—14, где
 - a) первый Fc-полипептид предусматривает первое полуантитело, содержащее тяжелую цепь первого антитела и легкую цепь первого антитела; и/или
 - b) второй Fc-полипептид предусматривает второе полуантитело, содержащее тяжелую цепь второго антитела и легкую цепь второго антитела.
18. Гетеродимерный белок по любому из пп. 1—6 и пп. 9—15, где
 - a) первый Fc-полипептид предусматривает первое полуантитело, содержащее тяжелую цепь первого антитела и легкую цепь первого антитела; и

b) второй Fc-полипептид предусматривает второе полуантитело, содержащее тяжелую цепь второго антитела и легкую цепь второго антитела.

19. Гетеродимерный белок по п. 17 или п. 18, где первое и второе полуантитела связываются с разными молекулами-мишенями или с разными областями одной и той же молекулы-мишени.

20. Гетеродимерный белок по любому из пп. 1—11 и пп. 13—19, где первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (необязательно на по меньшей мере 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1—3, 6—7, 10—11, 24—27, 48—51 и 62—65; и/или второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (необязательно на по меньшей мере 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, или 100% идентична) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1—3, 5, 12—13, 36—37, 60—61 и 66—67.

21. Гетеродимерный белок по п. 20, где первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (необязательно на по меньшей мере 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, или 100% идентична) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1—3, 6—7, 10—11, 24—27, 48—51 и 62—65; и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (необязательно на по меньшей мере 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, или 100% идентична) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1—3, 5, 12—13, 36—37, 60—61 и 66—67.

22. Гетеродимерный белок по любому из пп. 1—11 и пп. 13—21, где первый Fc-полипептид и второй Fc-полипептид содержат аминокислотные последовательности, которые на по меньшей мере 75% идентичны (необязательно на по меньшей мере 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93,

94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны) аминокислотным последовательностям под SEQ ID NOs: 24 и 36; 24 и 37; 25 и 36; 25 и 37; 26 и 36; 26 и 37; 27 и 36; 27 и 37; 48 и 60; 48 и 61; 49 и 60; 49 и 61; 50 и 60; 50 и 61; 51 и 60; 51 и 61; 62 и 66; 62 и 67; 63 и 66; 63 и 67; 64 и 66; 64 и 67; 65 и 66 или 65 и 67 соответственно.

23. Гетеродимерный белок по любому из пп. 1—22, где первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 51, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 61.

24. Гетеродимерный белок по любому из пп. 1—22, где первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 50, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 60.

25. Гетеродимерный белок по любому из пп. 1—22, где первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 51, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 60.

26. Гетеродимерный белок по любому из пп. 1—22, где первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 50, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 61.

27. Гетеродимерный белок по любому из пп. 2—22, где первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 49, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 61.

28. Гетеродимерный белок по любому из пп. 2—22, где первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 48, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 60.

29. Гетеродимерный белок по любому из пп. 2—22, где первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под

SEQ ID NO: 49, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 60.

30. Гетеродимерный белок по любому из пп. 2—22, где первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 48, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 61.

31. Гетеродимерный белок по любому из пп. 1—22, где первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 65, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 67.

32. Гетеродимерный белок по любому из пп. 1—22, где первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 64, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 66.

33. Гетеродимерный белок по любому из пп. 1—22, где первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 65, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 66.

34. Гетеродимерный белок по любому из пп. 1—22, где первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 64, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 67.

35. Гетеродимерный белок по любому из пп. 2—22, где первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 63, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 67.

36. Гетеродимерный белок по любому из пп. 2—22, где первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 62, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 66.

37. Гетеродимерный белок по любому из пп. 2—22, где первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 63, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 66.

38. Гетеродимерный белок по любому из пп. 2—22, где первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 62, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 67.

39. Гетеродимерный белок по любому из пп. 1—11 и пп. 13—22, где первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 27, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 37.

40. Гетеродимерный белок по любому из пп. 1—11 и пп. 13—22, где первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 26, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 36.

41. Гетеродимерный белок по любому из пп. 1—11 и пп. 13—22, где первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 27, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 36.

42. Гетеродимерный белок по любому из пп. 1—11 и пп. 13—22, где первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 26, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 37.

43. Гетеродимерный белок по любому из пп. 2—11 и пп. 13—22, где первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 25, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 37.

44. Гетеродимерный белок по любому из пп. 2—11 и пп. 13—22, где первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под

SEQ ID NO: 24, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 36.

45. Гетеродимерный белок по любому из пп. 2—11 и пп. 13—22, где первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 25, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 36.

46. Гетеродимерный белок по любому из пп. 2—11 и пп. 13—22, где первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 24, и второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 37.

47. Фармацевтическая композиция, содержащая гетеродимерный белок по любому из предыдущих пунктов и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

48. Выделенный полинуклеотид, кодирующий первый и второй Fc-полипептиды гетеродимерного белка по любому из предыдущих пунктов.

49. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 48.

50. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая

a) полинуклеотид по п. 48;

b) вектор по п. 49;

c) первый полинуклеотид, кодирующий первый Fc-полипептид гетеродимерного белка по любому из предыдущих пунктов, и второй полинуклеотид, кодирующий второй Fc-полипептид гетеродимерного белка по любому из предыдущих пунктов;

d) первый вектор, содержащий первый полинуклеотид, кодирующий первый Fc-полипептид гетеродимерного белка по любому из предыдущих пунктов, и второй вектор, содержащий второй полинуклеотид, кодирующий второй Fc-полипептид гетеродимерного белка по любому из предыдущих пунктов;

e) первый полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь первого антитела гетеродимерного белка по п. 18, и второй полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь

второго антитела гетеродимерного белка по п. 18, и необязательно третий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь первого антитела гетеродимерного белка по п. 18, и/или четвертый полинуклеотид, кодирующий легкую цепь второго антитела гетеродимерного белка по п. 18; или

f) первый вектор, содержащий первый полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь первого антитела гетеродимерного белка по п. 18, и второй вектор, содержащий второй полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь второго антитела гетеродимерного белка по п. 18, и необязательно третий вектор, содержащий третий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь первого антитела гетеродимерного белка по п. 18, и/или четвертый вектор, содержащий четвертый полинуклеотид, кодирующий легкую цепь второго антитела гетеродимерного белка по п. 18.

51. Способ получения гетеродимерного белка, предусматривающий осуществление экспрессии в клетке

a) первого полинуклеотида, кодирующего первый Fc-полипептид гетеродимерного белка по любому из пп. 1—46; и

b) второго полинуклеотида, кодирующего второй Fc-полипептид гетеродимерного белка по любому из пп. 1—46,

в условиях, при которых продуцируется гетеродимерный белок.

52. Способ получения гетеродимерного белка, предусматривающий осуществление экспрессии в клетке

a) первого полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь первого антитела гетеродимерного белка по п. 18;

b) второго полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь второго антитела гетеродимерного белка по п. 18;

c) третьего полинуклеотида, кодирующего легкую цепь первого антитела гетеродимерного белка по п. 18; и

d) четвертого полинуклеотида, кодирующего легкую цепь второго антитела гетеродимерного белка по п. 18,

в условиях, при которых продуцируется гетеродимерный белок.

53. Способ получения гетеродимерного белка, при этом способ предусматривает:

а) осуществление экспрессии в первой клетке первого полинуклеотида, кодирующего первый Fc-полипептид гетеродимерного белка по любому из пп. 1—46, в условиях, при которых продуцируется первый Fc-полипептид;

б) осуществление экспрессии во второй клетке второго полинуклеотида, кодирующего второй Fc-полипептид гетеродимерного белка по любому из пп. 1—46, в условиях, при которых продуцируется второй Fc-полипептид; и

с) приведение в контакт первого и второго Fc-полипептидов, полученных на стадиях (а) и (б), в условиях, при которых первый Fc-полипептид и второй Fc-полипептид гетеродимеризуются с получением гетеродимерного белка.

54. Способ получения гетеродимерного, при этом способ предусматривает:

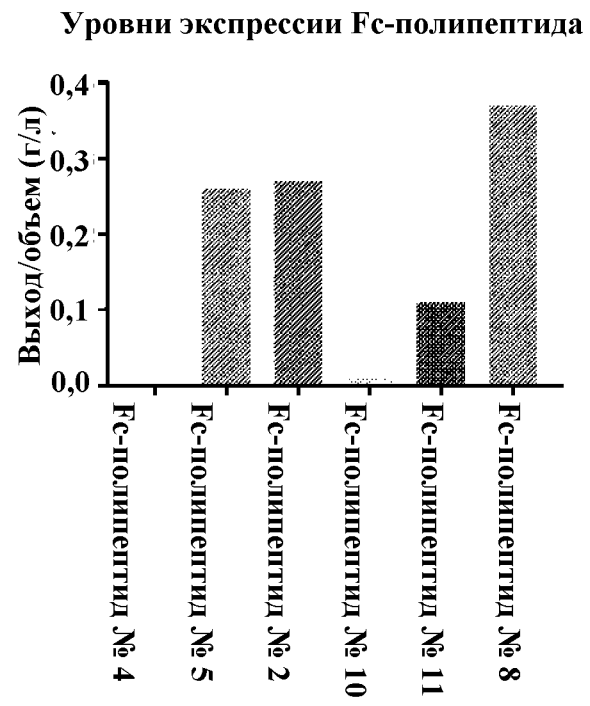
а) осуществление экспрессии в первой клетке первого полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь первого антитела гетеродимерного белка по п. 18, и второго полинуклеотида, кодирующего легкую цепь первого антитела гетеродимерного белка по п. 18, в условиях, при которых продуцируется первый Fc-полипептид;

б) осуществление экспрессии во второй клетке третьего полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь второго антитела гетеродимерного белка по п. 18, и четвертого полинуклеотида, кодирующего легкую цепь второго антитела гетеродимерного белка по п. 18, в условиях, при которых продуцируется второй Fc-полипептид; и

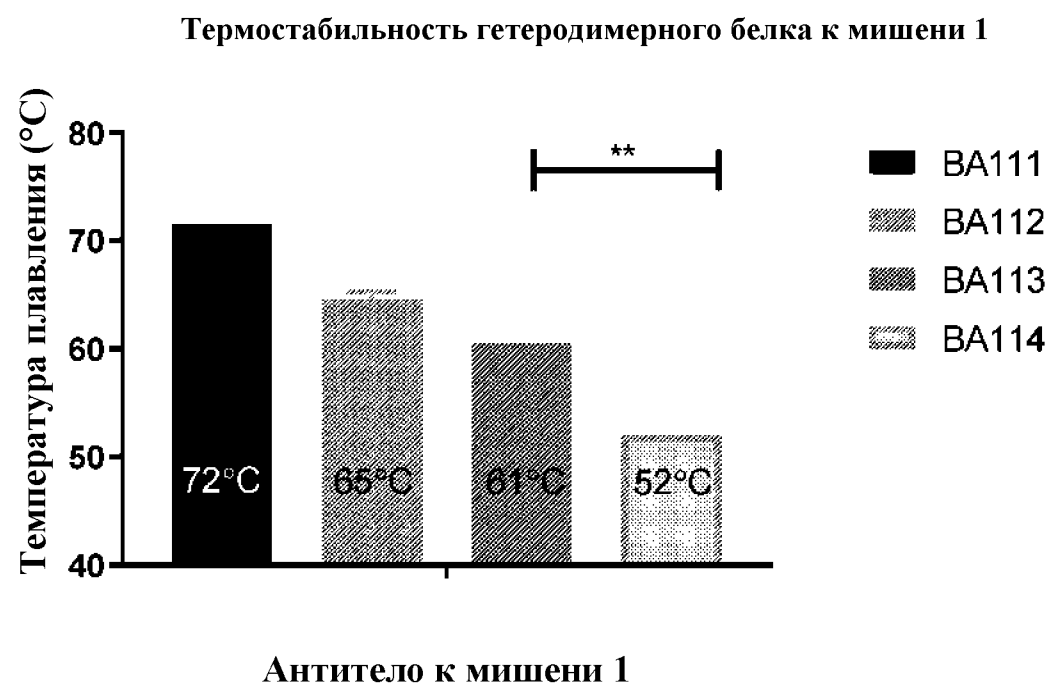
с) приведение в контакт первого и второго Fc-полипептидов, полученных на стадиях (а) и (б), в условиях, при которых первый Fc-полипептид и второй Fc-полипептид гетеродимеризуются с получением гетеродимерного белка.

55. Способ получения гетеродимерного белка, предусматривающий приведение в контакт первого Fc-полипептида и второго Fc-полипептида гетеродимерного белка по любому из пп. 1—46 в условиях, при которых первый Fc-полипептид и второй Fc-полипептид гетеродимеризуются с получением гетеродимерного белка.

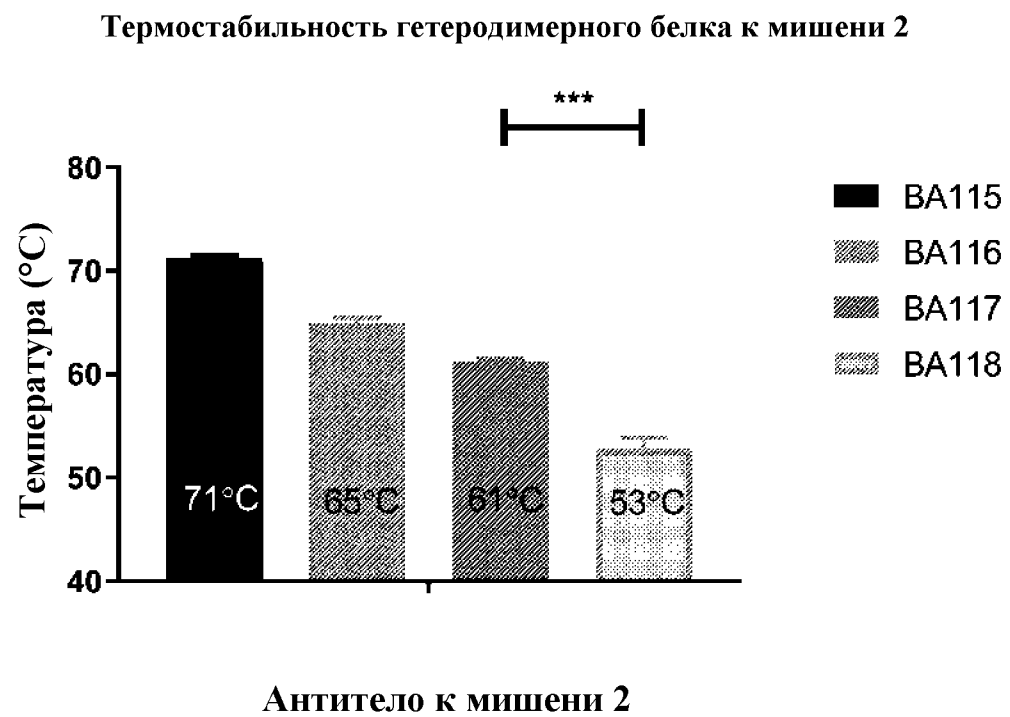
Фигура 1



Фигура 2А

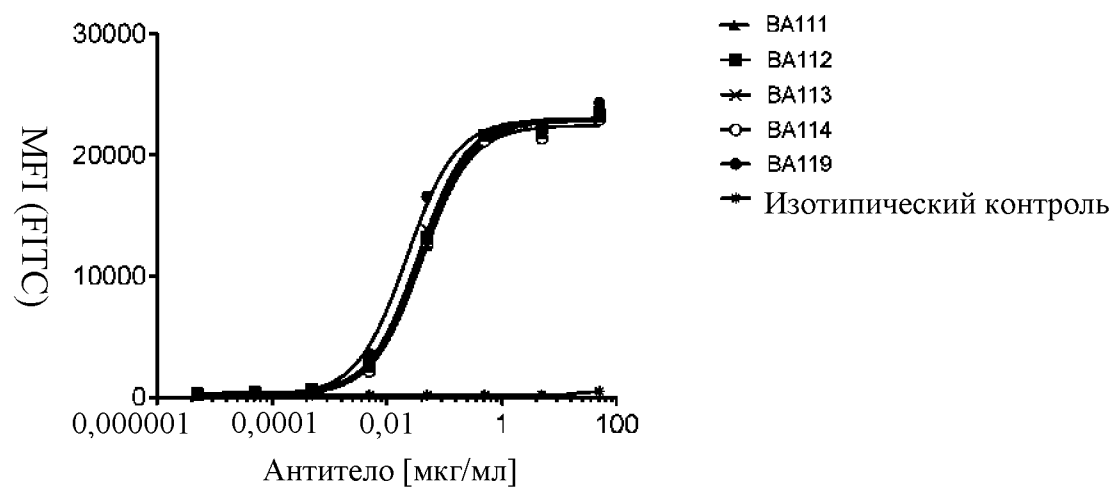


Фигура 2В



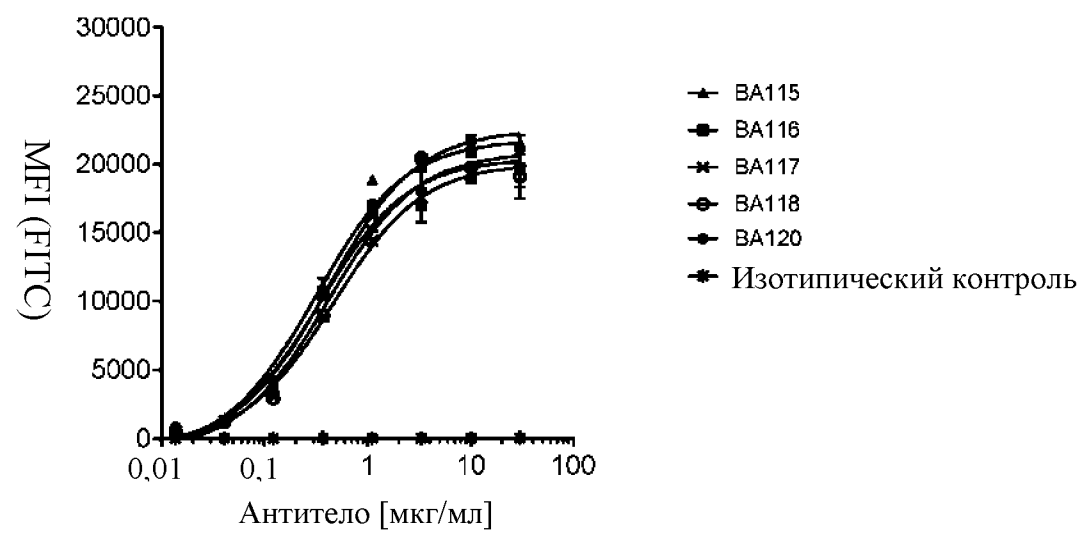
Фигура 3

Мишень 1: связывание



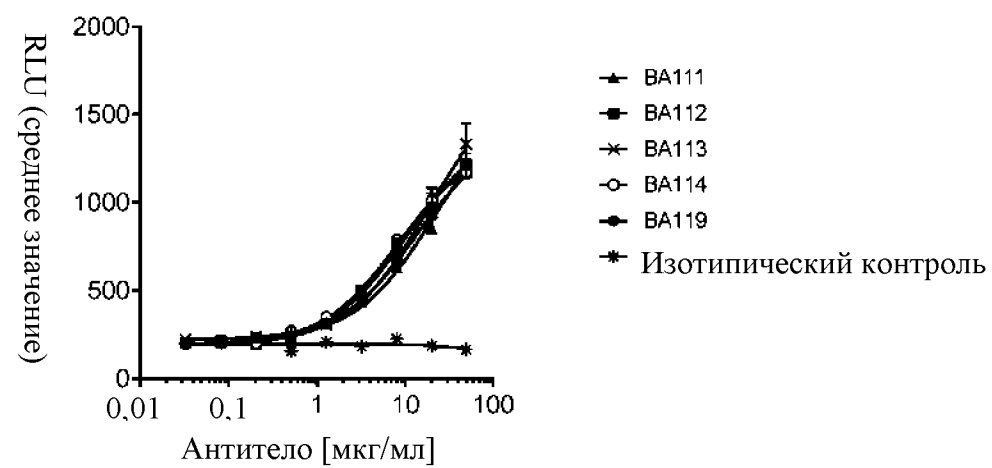
Фигура 4

Мишень 2: связывание



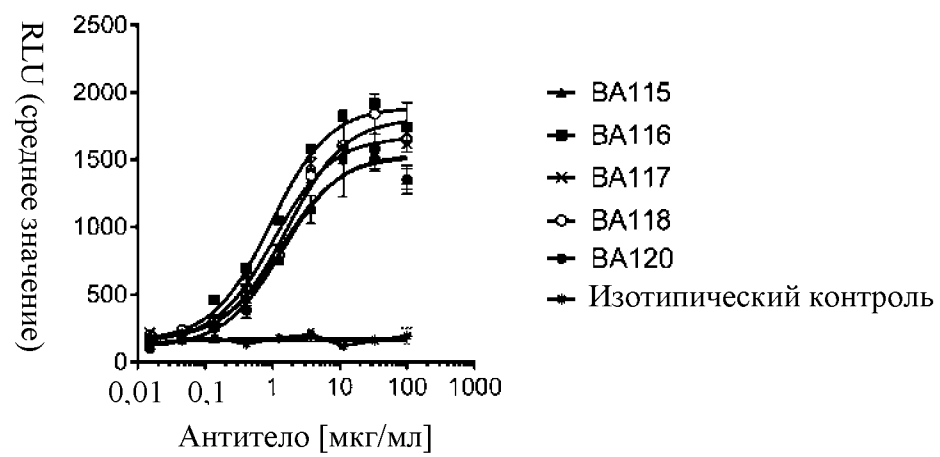
Фигура 5

Мишень 1: блокирование



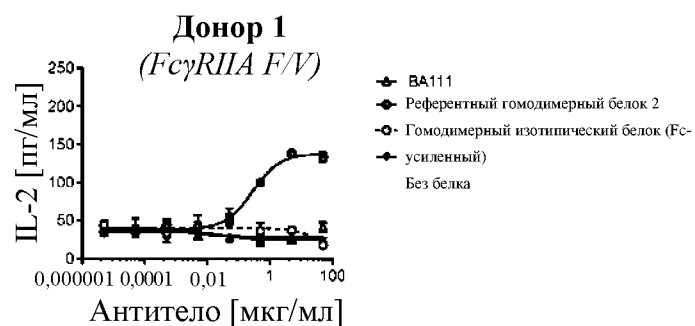
Фигура 6

Мишень 2: блокирование

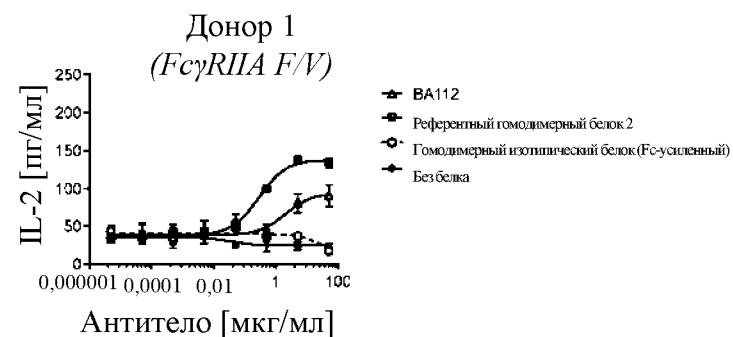


Мишень 1: анализ с использованием SEA

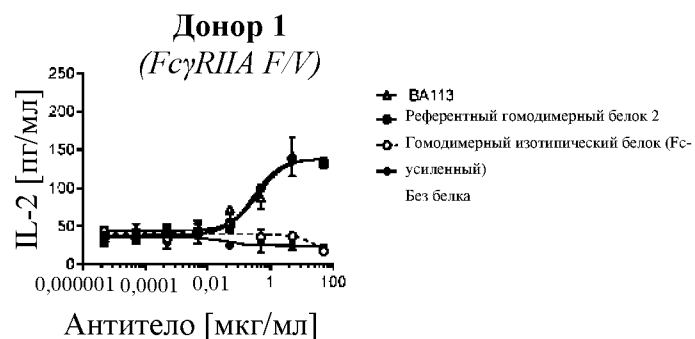
Фигура 7А



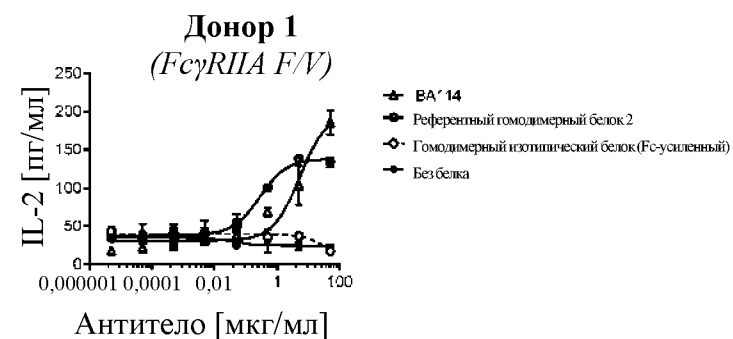
Фигура 7В



Фигура 7С

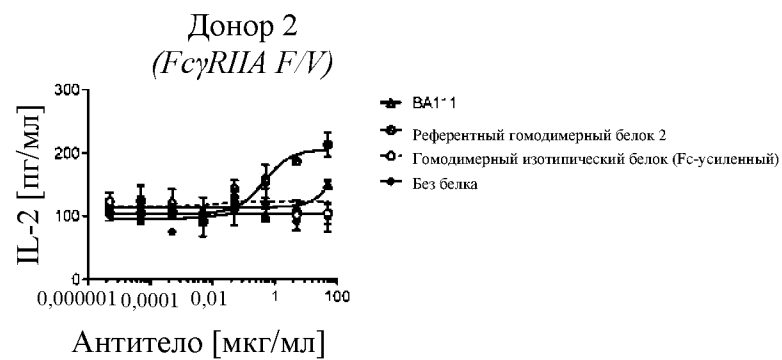


Фигура 7D

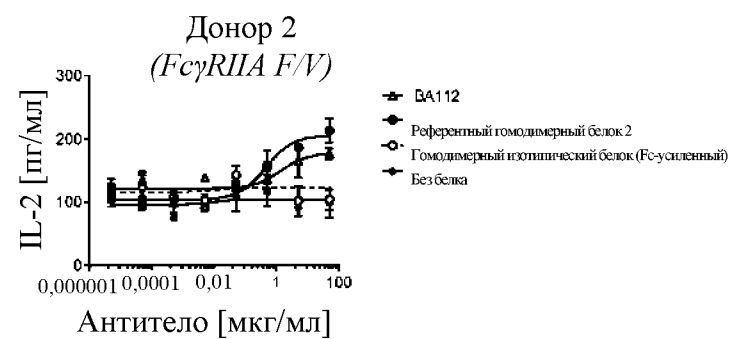


Мишень 1: анализ с использованием SEA

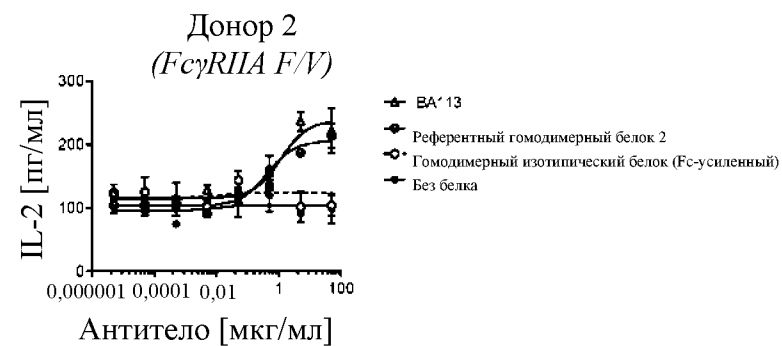
Фигура 7E



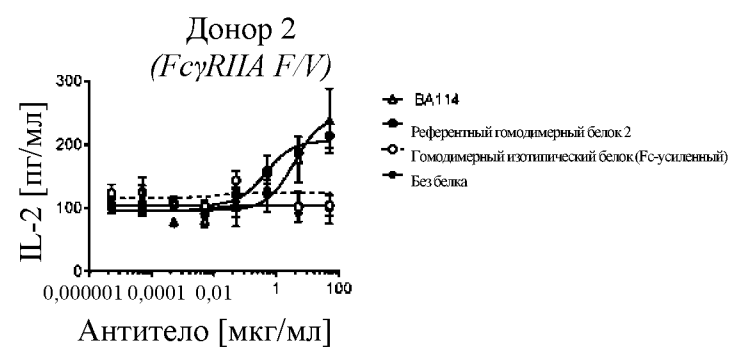
Фигура 7F



Фигура 7G

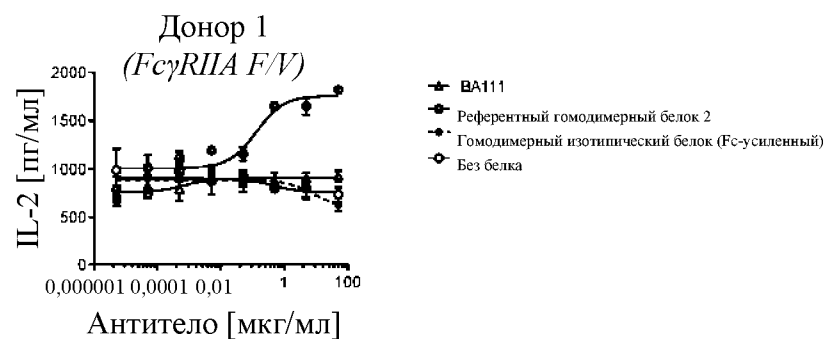


Фигура 7H

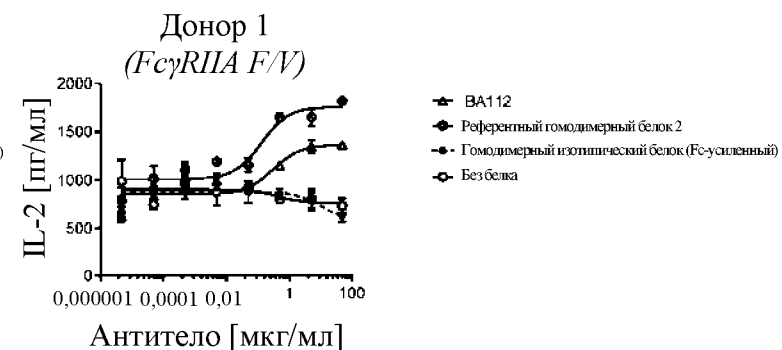


Мишень 1: анализ с использованием SEA

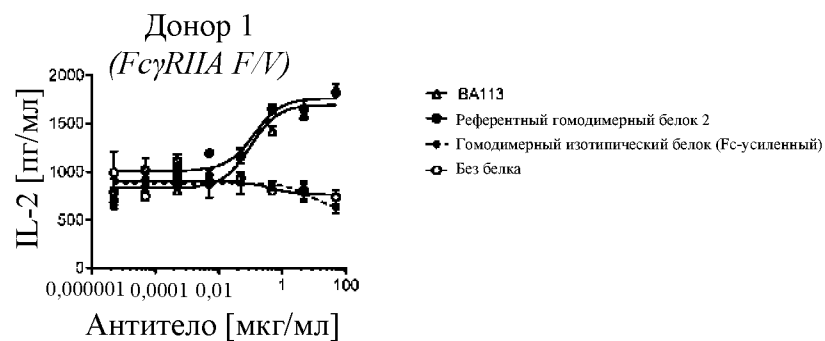
Фигура 7I



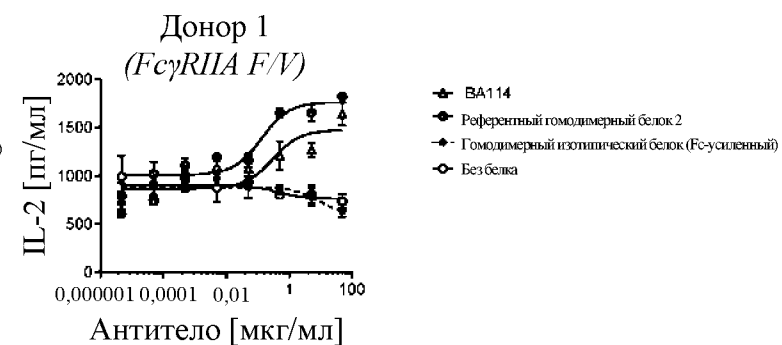
Фигура 7J



Фигура 7K

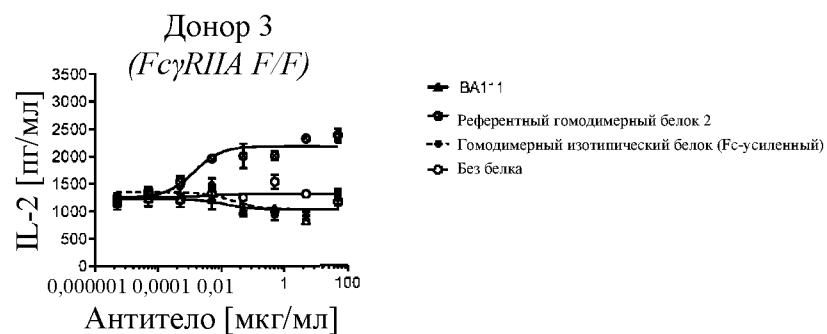


Фигура 7L

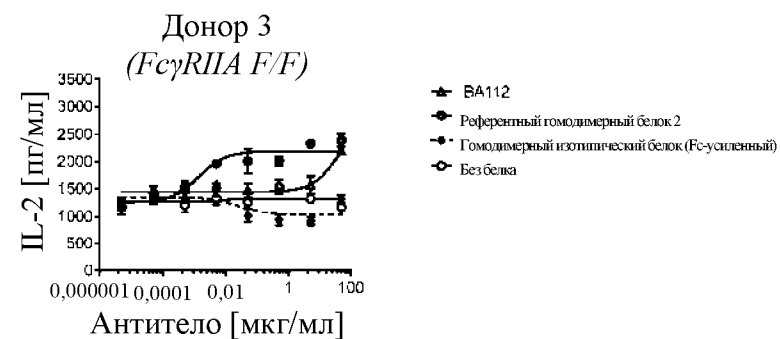


Мишень 1: анализ с использованием SEA

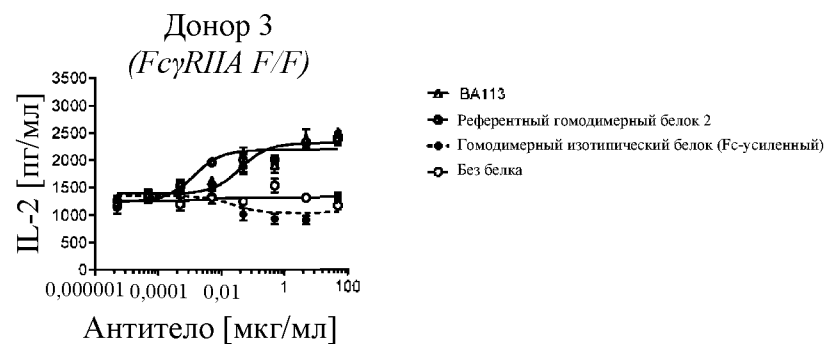
Фигура 7М



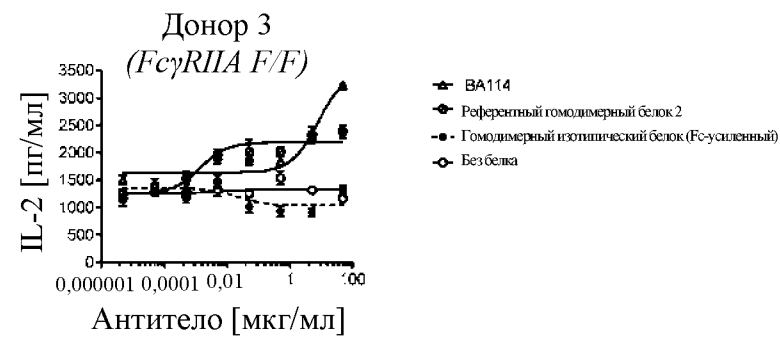
Фигура 7N



Фигура 7О

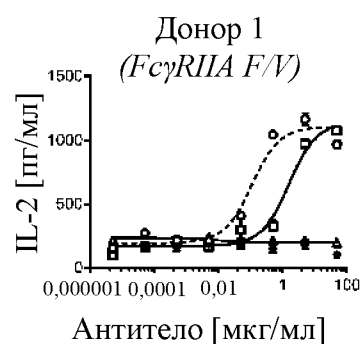


Фигура 7Р

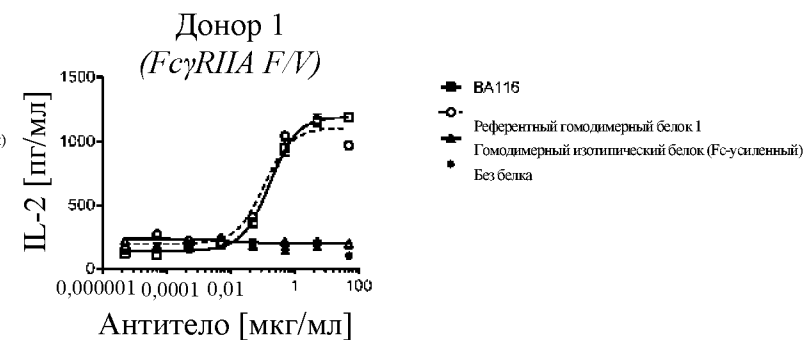


Мишень 2: анализ с использованием SEA

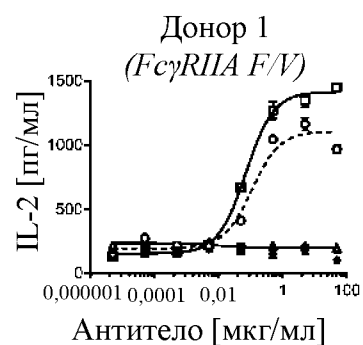
Фигура 8А



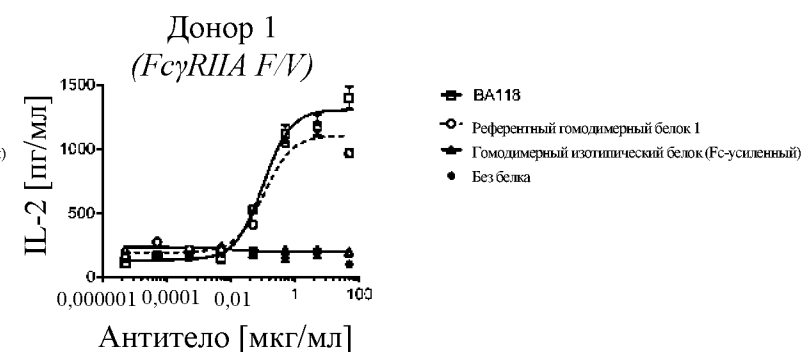
Фигура 8В



Фигура 8С

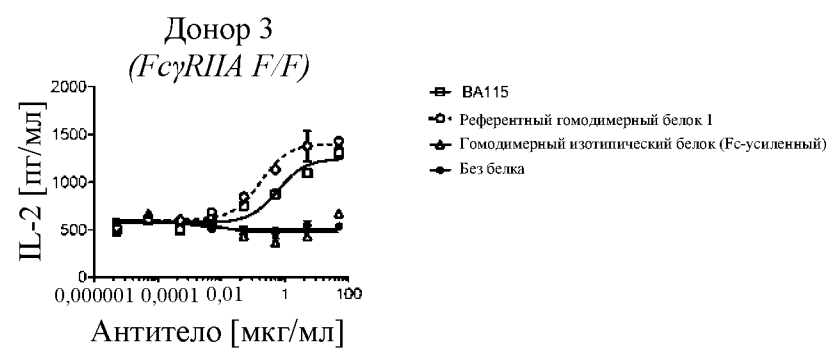


Фигура 8D

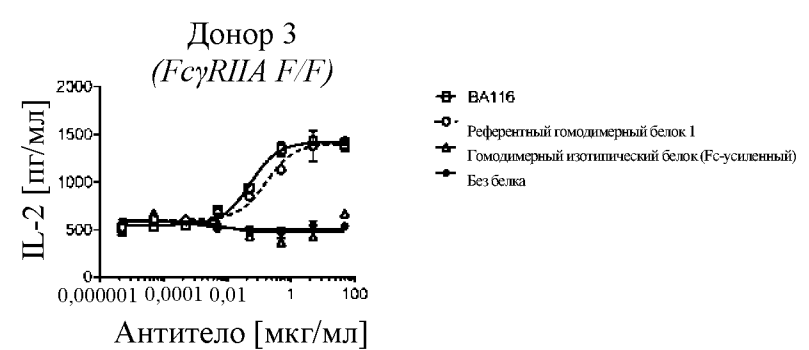


Мишень 2: анализ с использованием SEA

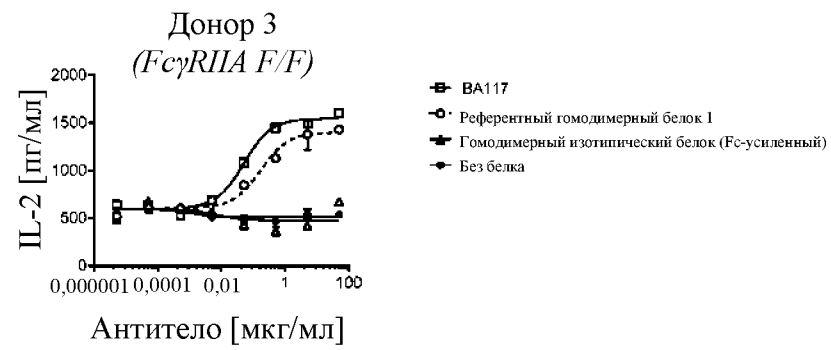
Фигура 8Е



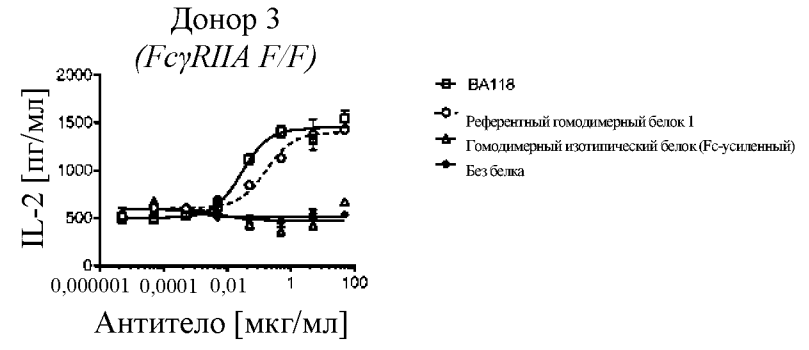
Фигура 8F



Фигура 8G

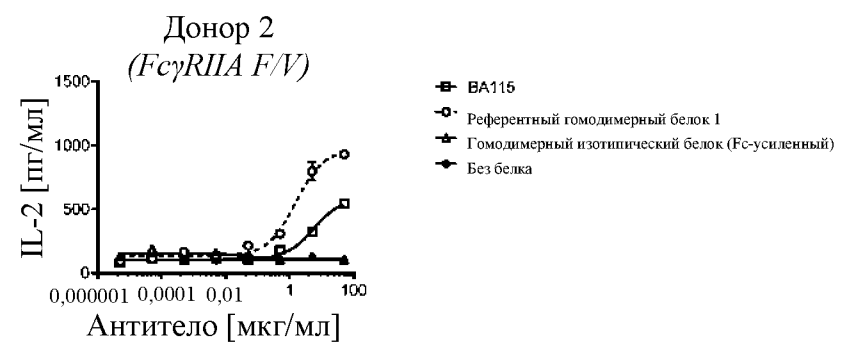


Фигура 8H

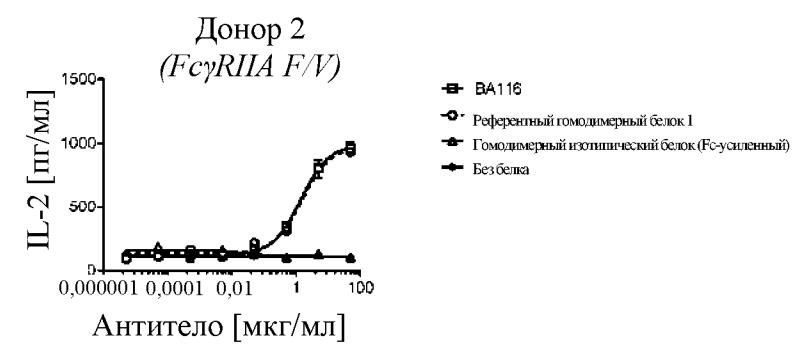


Мишень 2: анализ с использованием SEA

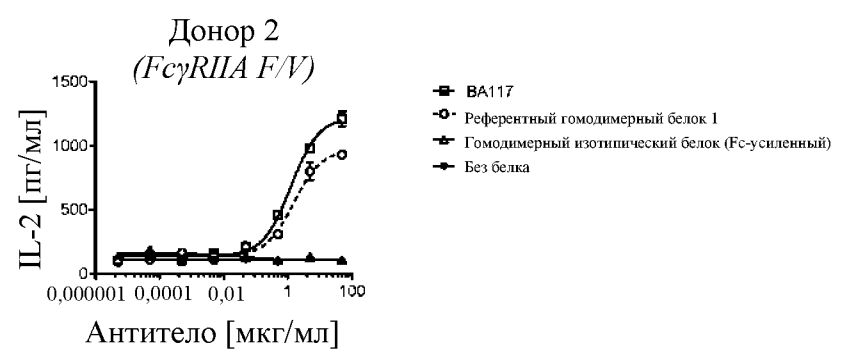
Фигура 8I



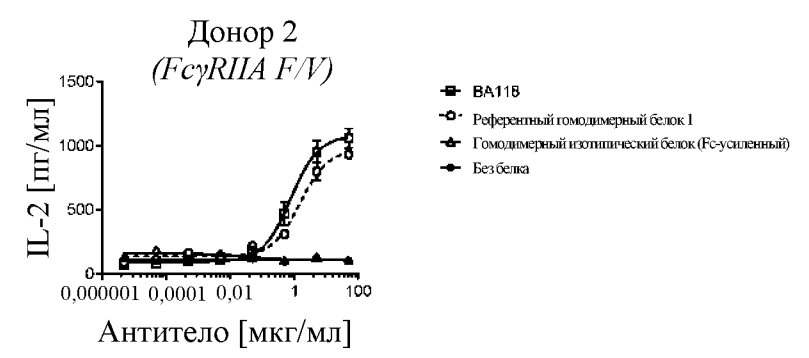
Фигура 8J



Фигура 8K

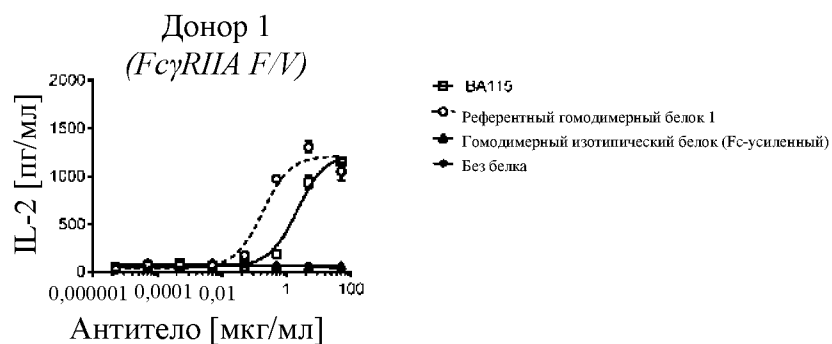


Фигура 8L

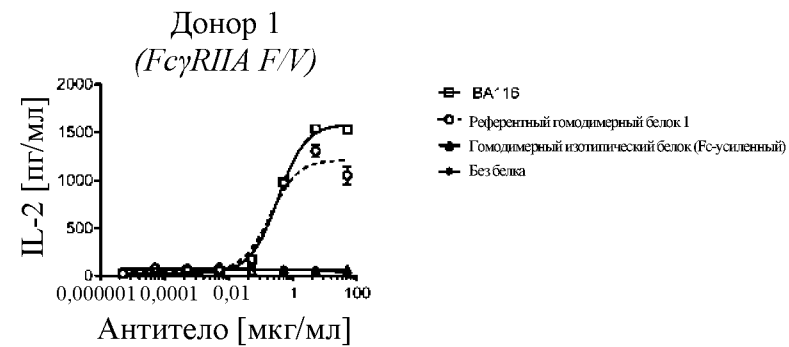


Мишень 2: анализ с использованием SEA

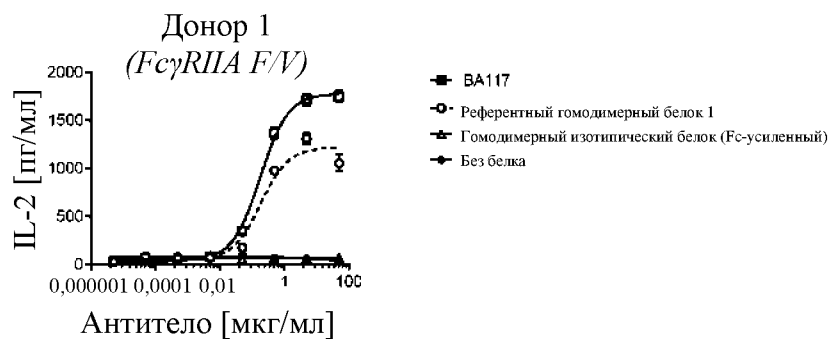
Фигура 8М



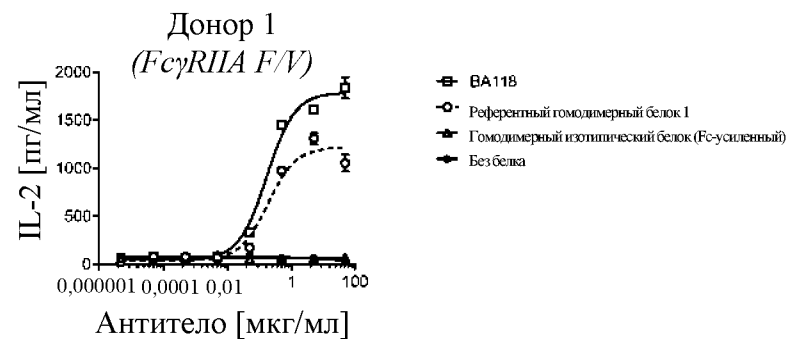
Фигура 8N



Фигура 8О

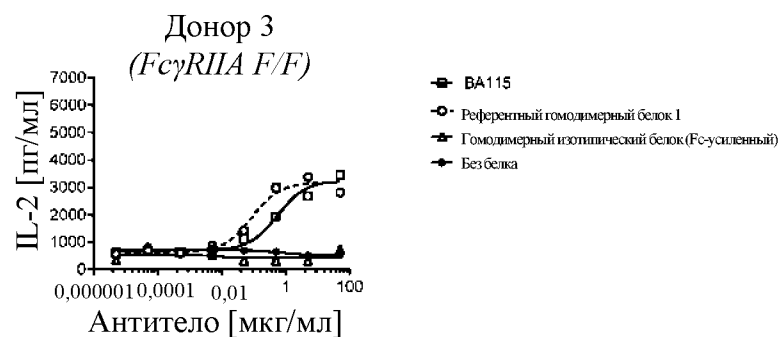


Фигура 8Р

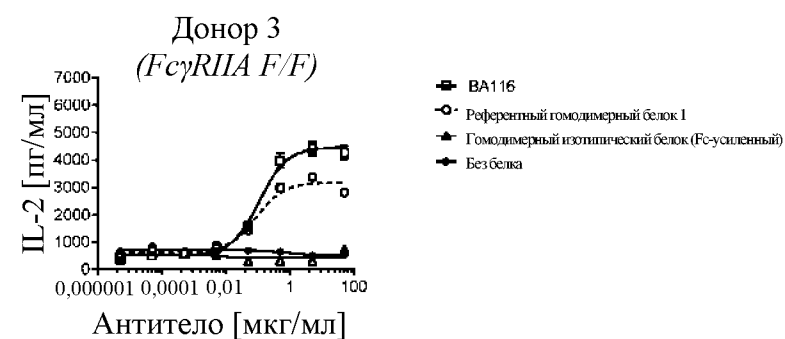


Мишень 2: анализ с использованием SEA

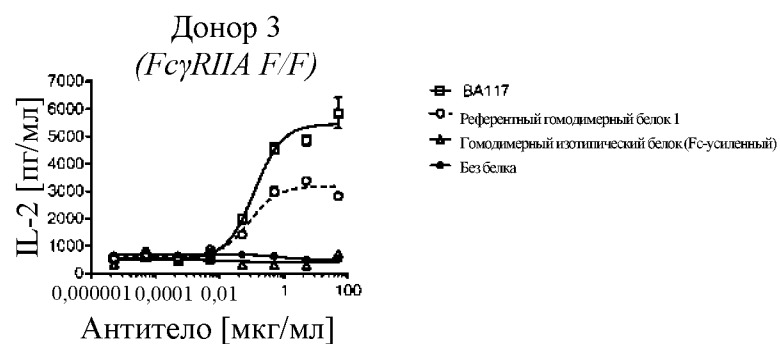
Фигура 8Q



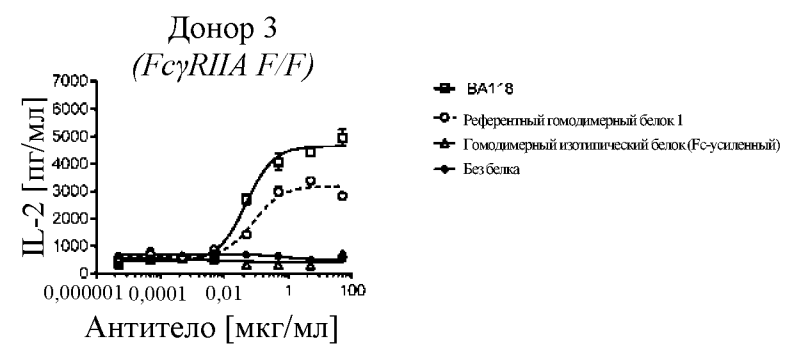
Фигура 8R



Фигура 8S

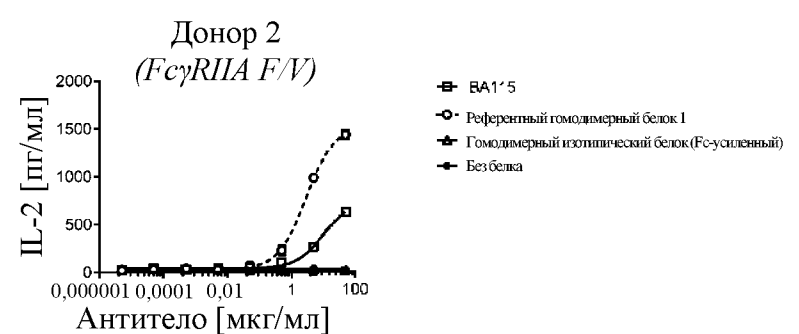


Фигура 8T

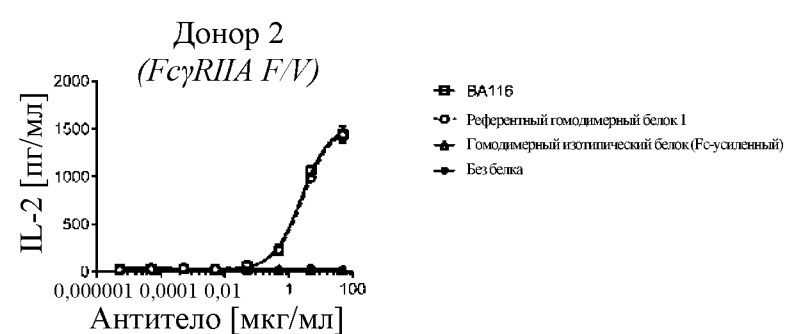


Мишень 2: анализ с использованием SEA

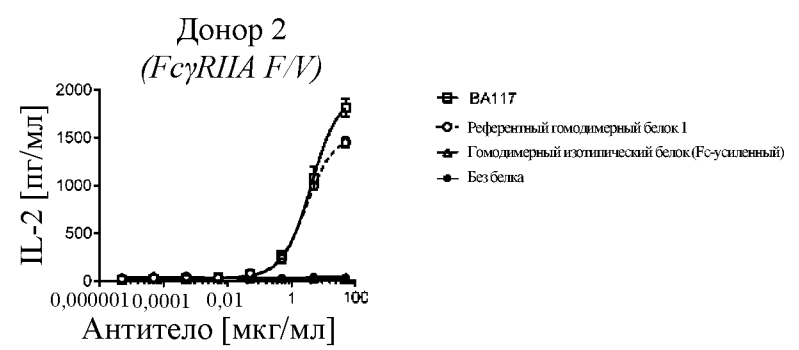
Фигура 8U



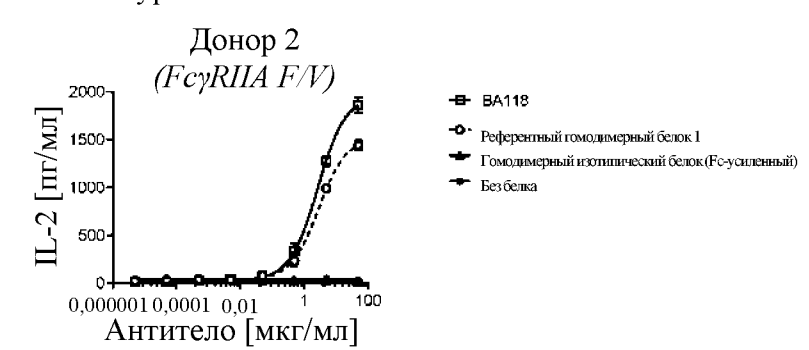
Фигура 8V



Фигура 8W

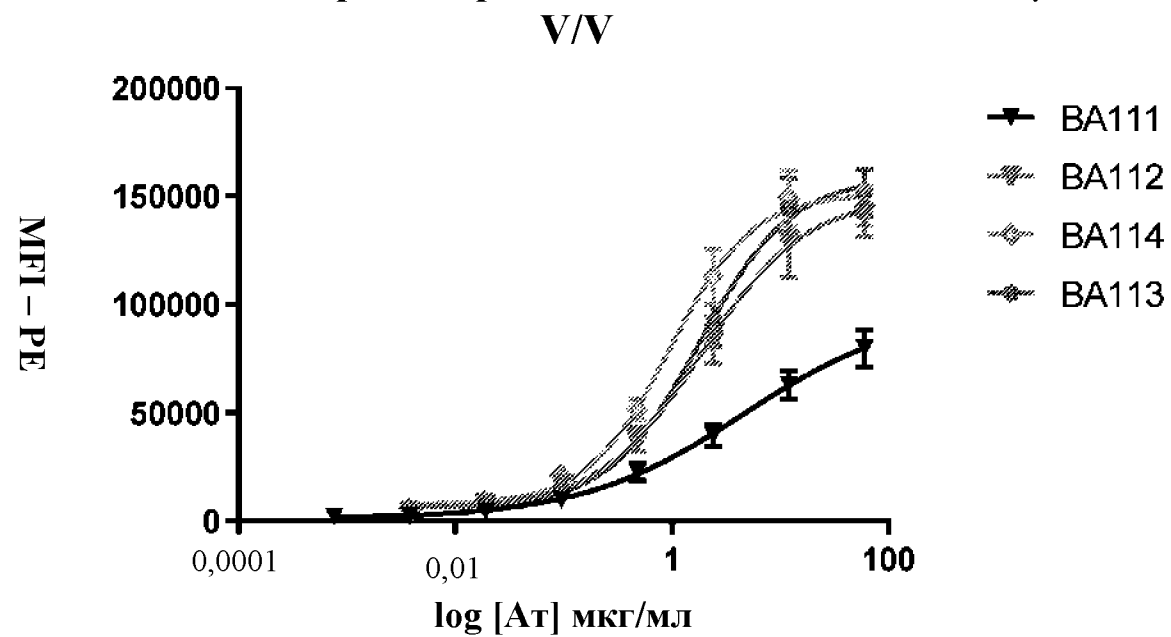


Фигура 8X



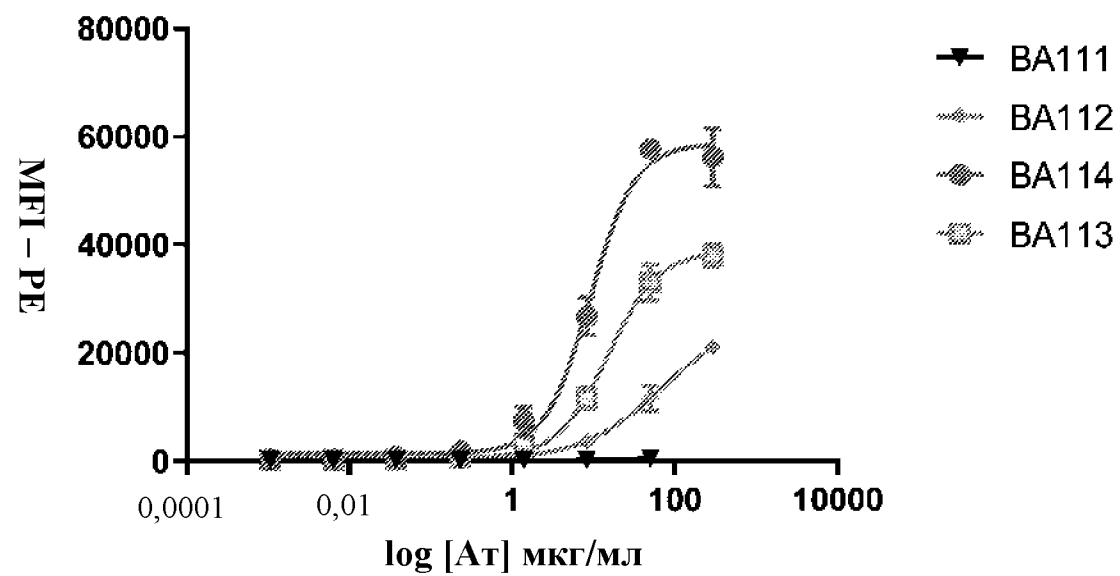
Фигура 9А

Связывание гетеродимерного белка к мишени 1 с FcγRIIIa



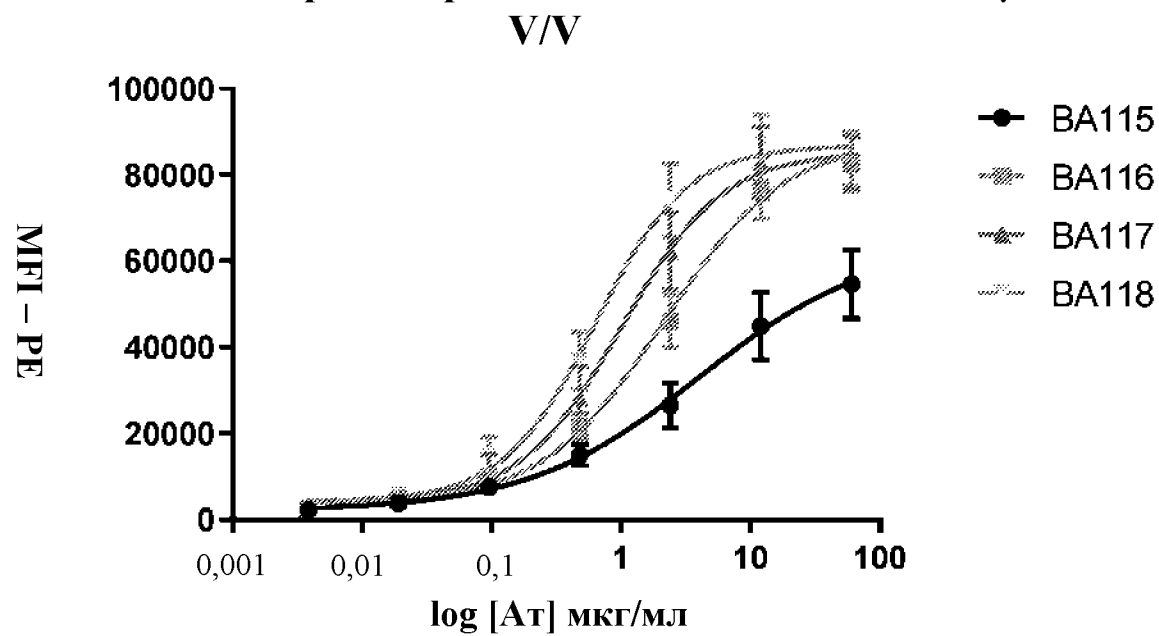
Фигура 9В

Связывание гетеродимерного белка к мишени 1 с FcγRIIIa
F/F



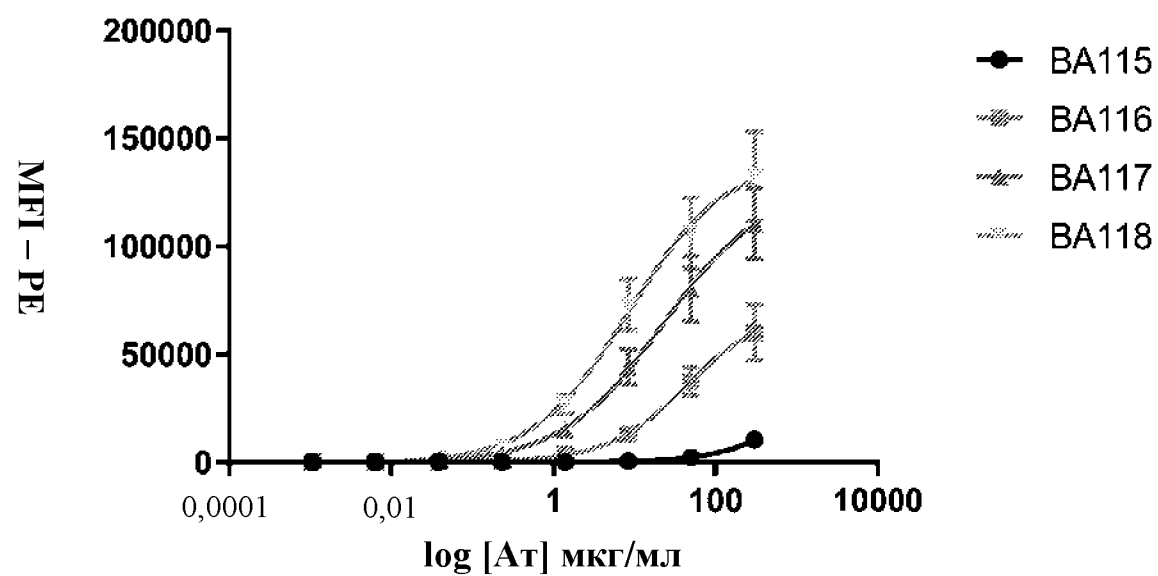
Фигура 10А

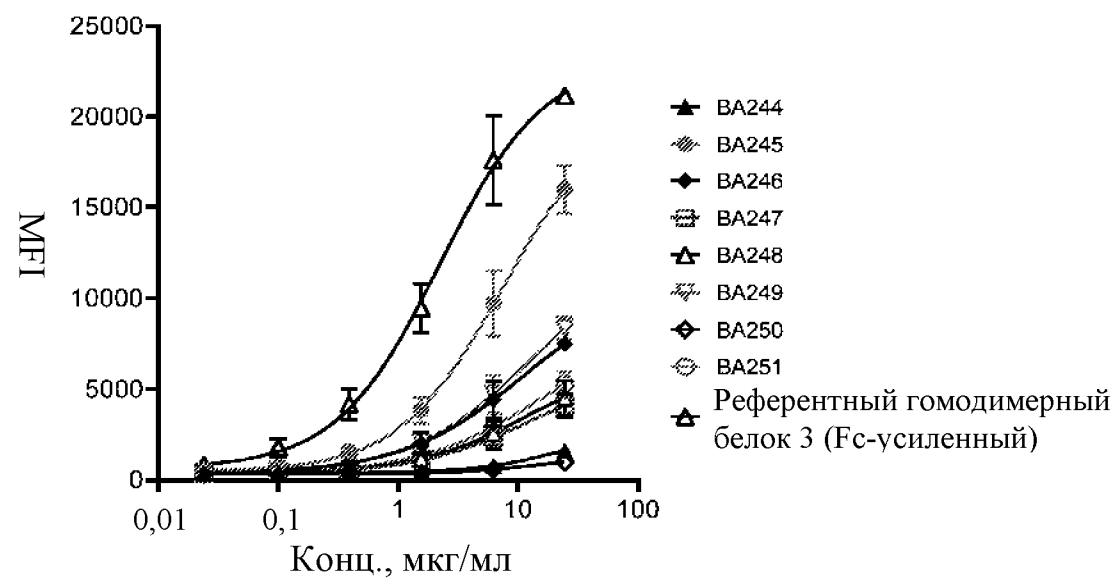
Связывание гетеродимерного белка к мишени 2 с FcγRIIIa



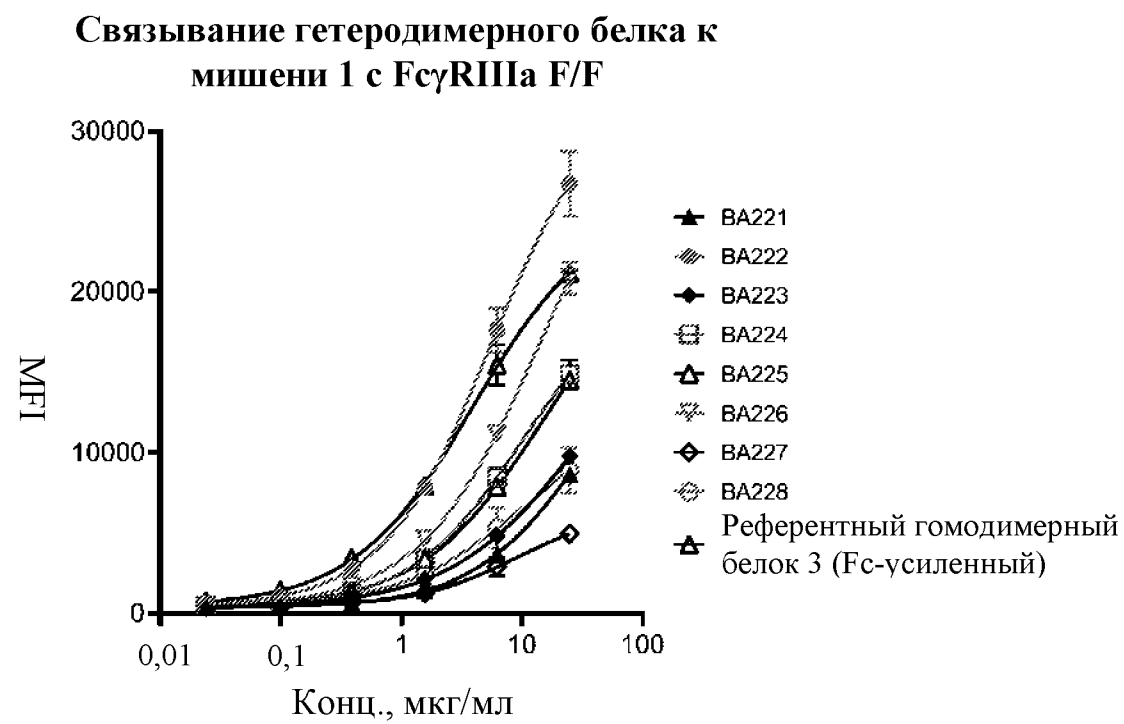
Фигура 10В

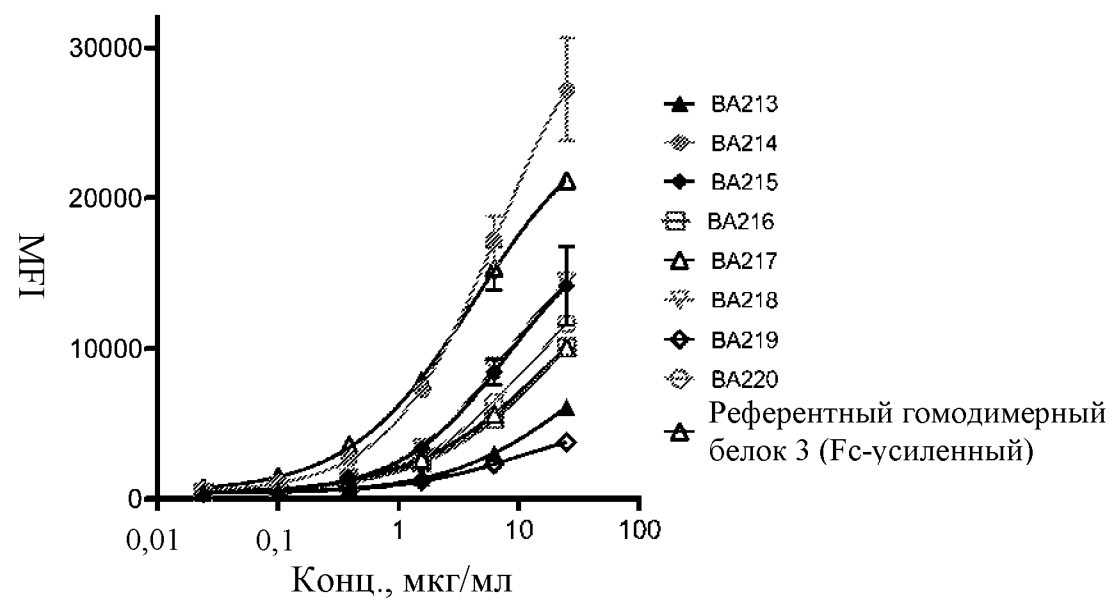
Связывание гетеродимерного белка к мишени 2 с FcγRIIIa
F/F



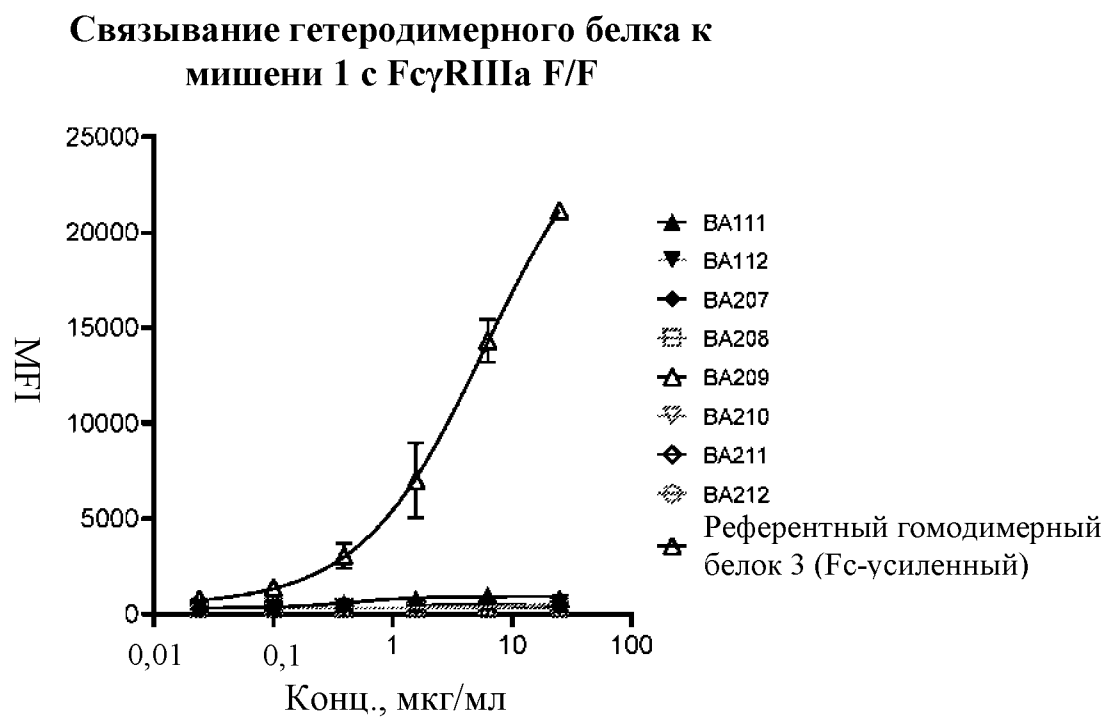


Фигура 11В

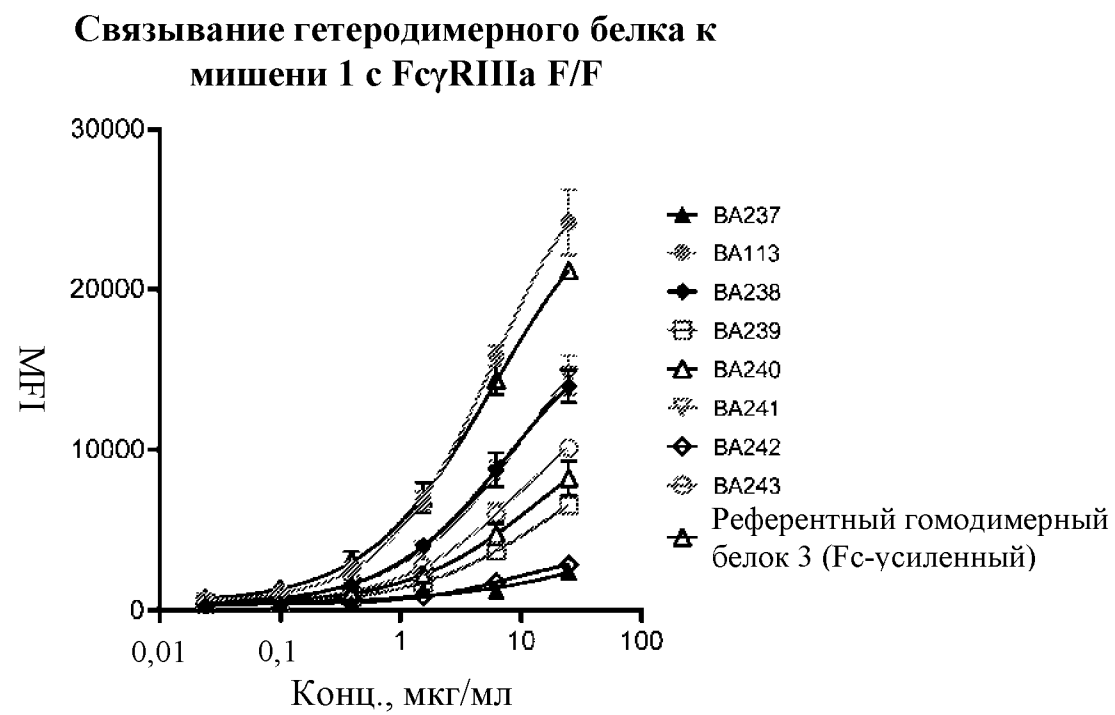




Фигура 11D

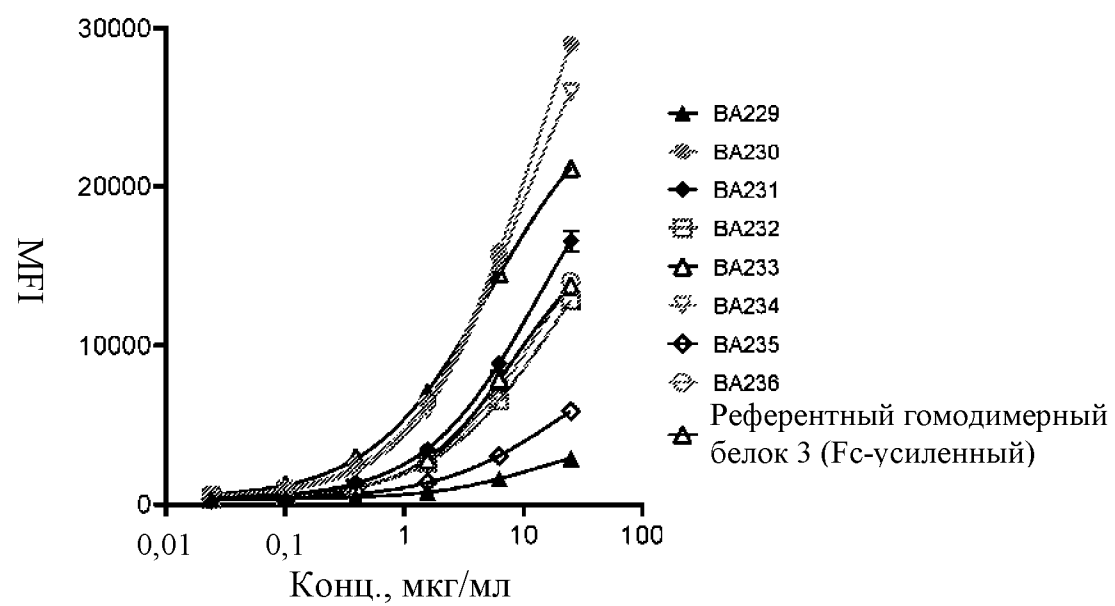


Фигура 11Е



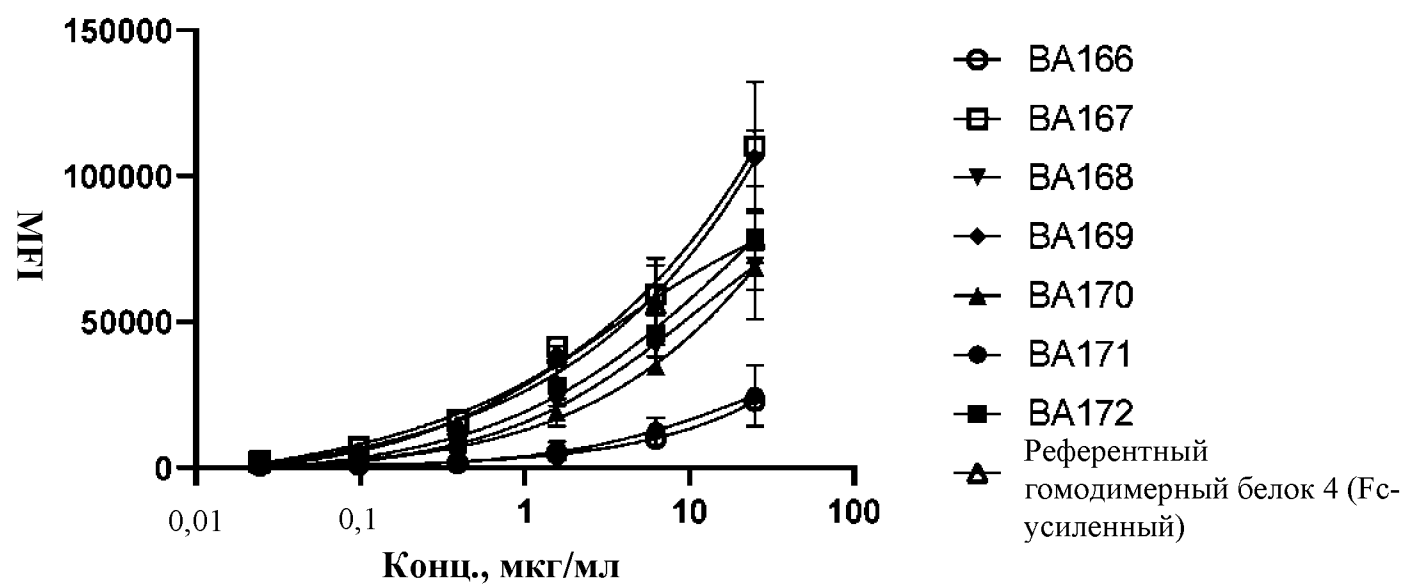
Фигура 11G

Связывание гетеродимерного белка к
мишени 1 с FcγRIIIa F/F

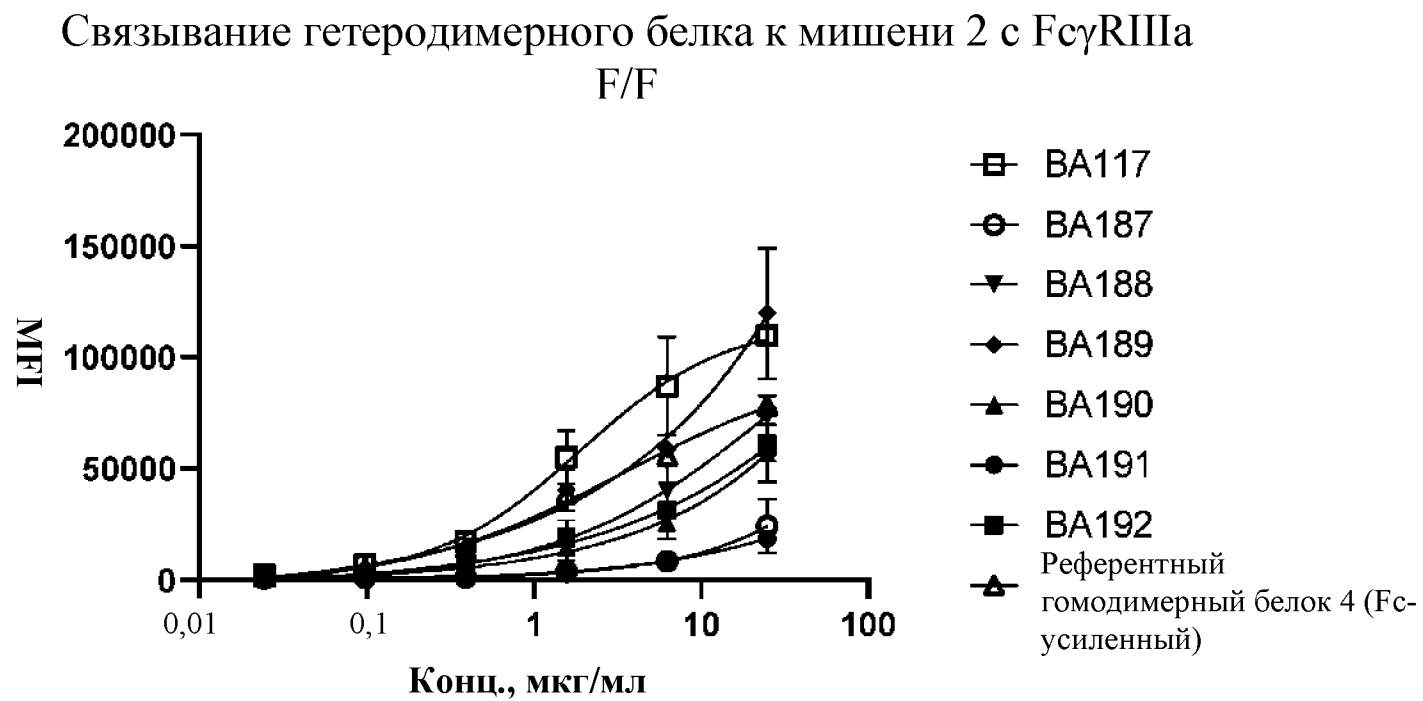


Фигура 12А

Связывание гетеродимерного белка к мишени 2 с FcγRIIIa
F/F

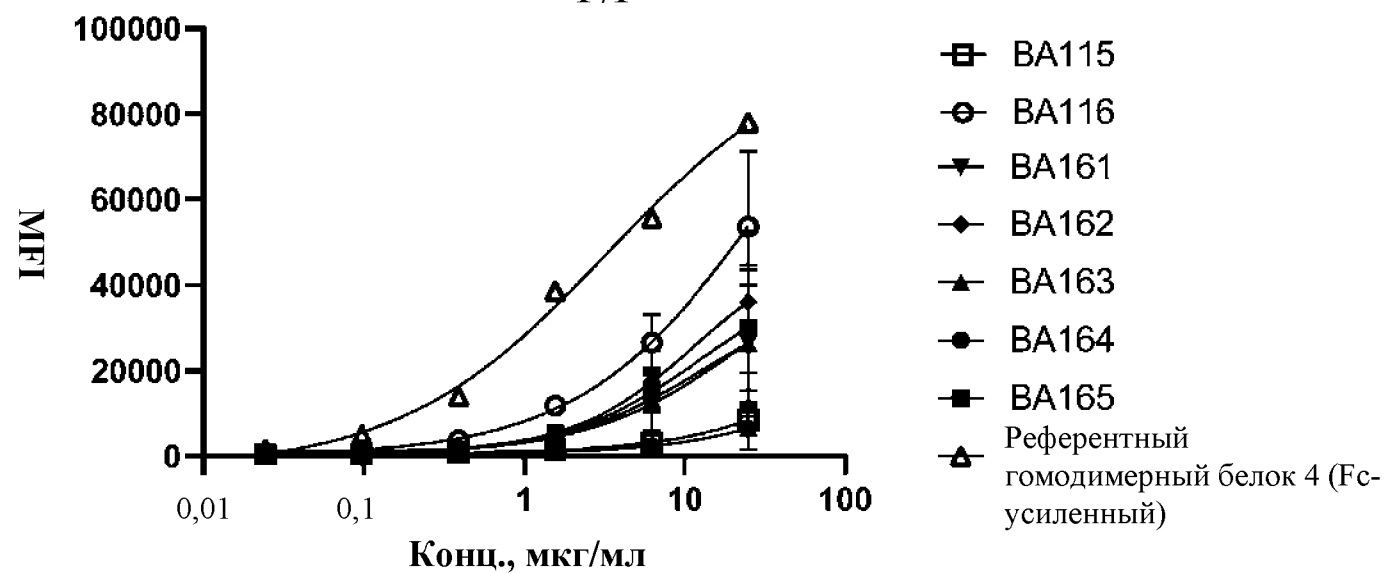


Фигура 12В



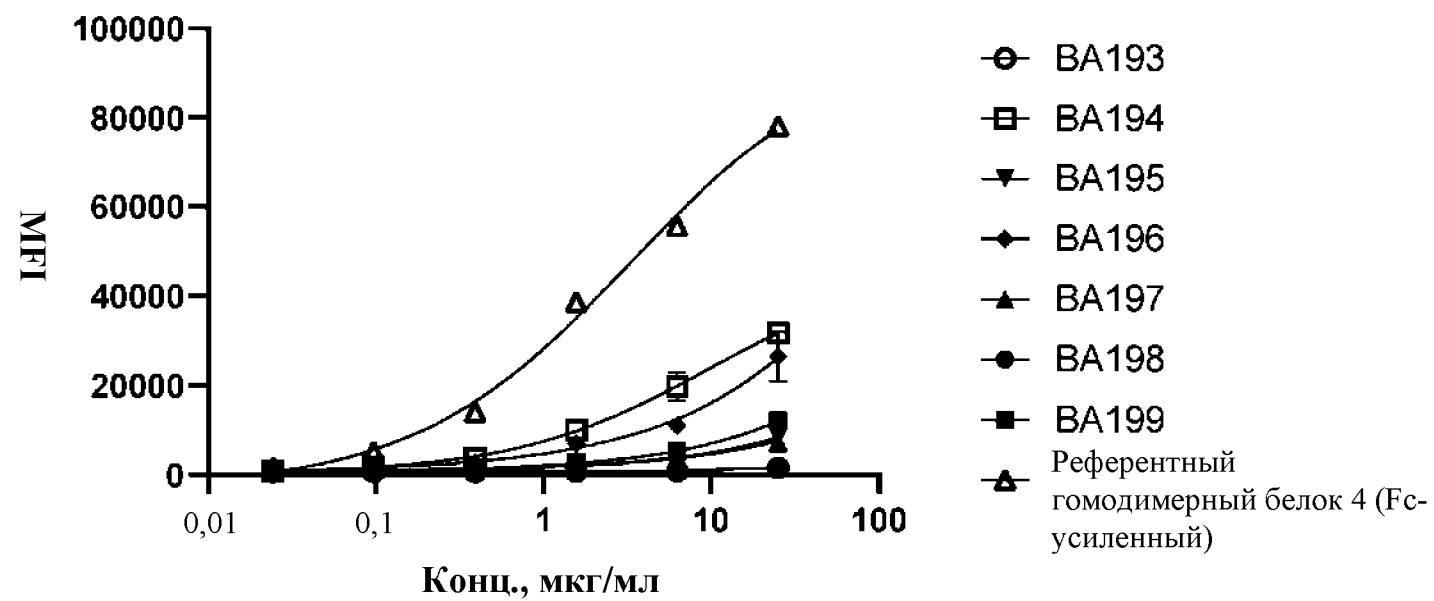
Фигура 12С

Связывание гетеродимерного белка к мишени 2 с FcγRIIIa
F/F

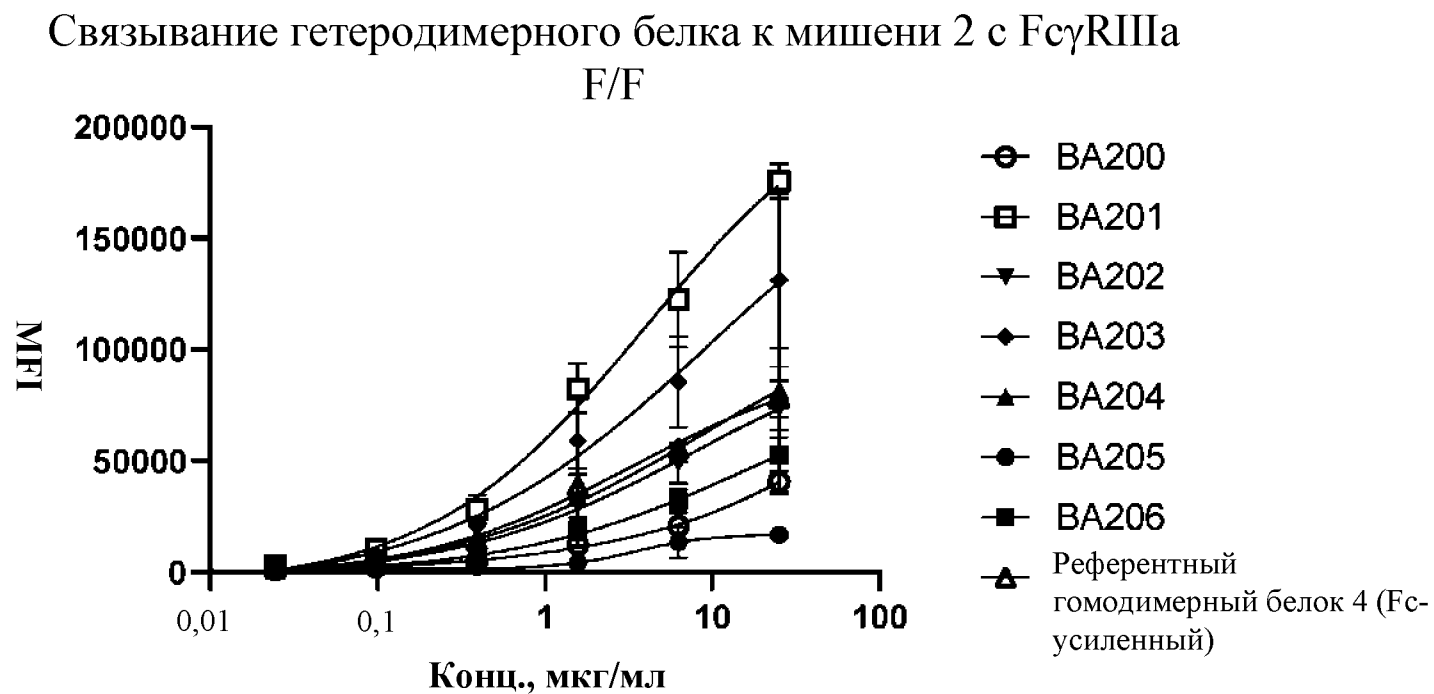


Фигура 12D

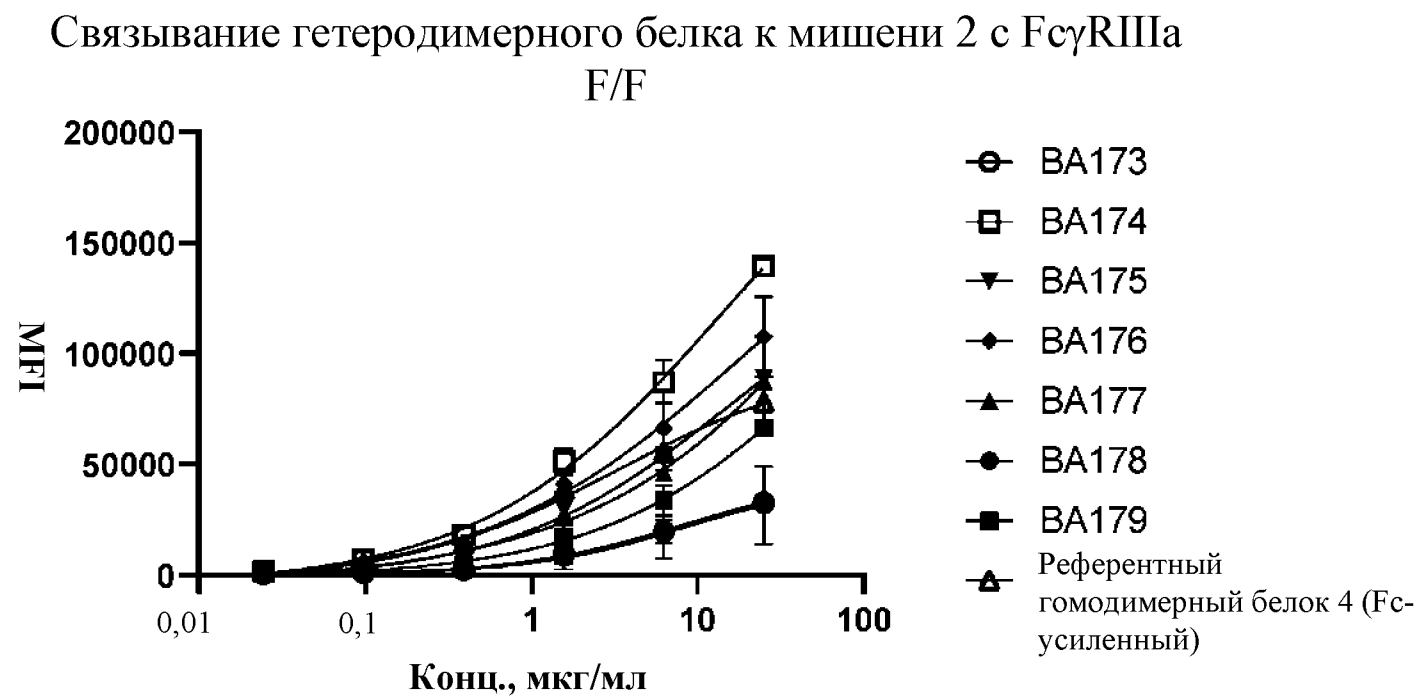
Связывание гетеродимерного белка к мишени 2 с Fc γ RIIIa
F/F



Фигура 12Е



Фигура 12F



Фигура 12G

