

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042601**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.03

(21) Номер заявки
201990285

(22) Дата подачи заявки
2017.09.28

(51) Int. Cl. **C07K 16/00** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **ГЕТЕРОДИМЕРНЫЕ ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫЕ КОНСТРУКЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ**

(31) **201610863814.7**

(32) **2016.09.29**

(33) **CN**

(43) **2019.12.30**

(86) **PCT/CN2017/104044**

(87) **WO 2018/059502 2018.04.05**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БЕЙДЖИН ХАНМИ
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД. (CN)**

(72) Изобретатель:
**Лю Цзяван, Сун Нанмэн, Ян Дунгэ,
Ян Япин, Ким Мэнсон (CN)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В. (RU)**

(56) **WO-A1-2013063702
WO-A1-2012058768
WO-A1-2013157954
WO-A1-2013157953
WO-A1-2010121766
WO-A1-2014049003
WO-A1-9627011**

(57) Согласно настоящему изобретению предложен способ получения стабильных и высокоспецифичных гетеродимерных иммуноглобулиновых конструкций, например биспецифичных антител, сохраняющих желаемые свойства нативных IgG без нежелательного ошибочного спаривания тяжелых и легких цепей, которые могут одновременно связываться с двумя молекулами-мишенями и обладают более высокой эффективностью в лечении сложных заболеваний.

B1**042601****042601****B1**

I. Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка притязает на приоритет заявки на патент Китая № CN 2016108638147, поданной 29 сентября 2016 г., описание которой полностью включено сюда посредством ссылки.

II. Область изобретения

Областью изобретения являются стабильные и высокоспецифичные иммуноглобулиновые конструкции, сохраняющие желаемые свойства нативных антител IgG без нежелательного ошибочного спаривания тяжелых и легких цепей.

III. Предшествующий уровень техники

Моноклональные антитела (mAb), обладающие моноспецифичностью и взаимодействующие только с одним эпитопом антигена-мишени, широко применяются для лечения многих заболеваний, включая различные виды рака, воспалительные, аутоиммунные и инфекционные заболевания. Тем не менее, на данный момент ни одна из этих терапевтических молекул не продемонстрировала достаточно высокой эффективности в виде монотерапии, что обусловлено сложной природой таких заболеваний, как рак или воспалительные расстройства, которые обычно опосредованы множеством патогенетических молекулярных путей, а также перекрестным взаимодействием сигнальных каскадов. Поскольку такие mAb взаимодействуют лишь с одним антигеном-мишенью, обеспечение оптимальных терапевтических эффектов затруднено. Одновременная блокада нескольких мишеней или нескольких сайтов одной мишени должна привести к повышению эффективности лечения. Кроме того, целевое воздействие на несколько антигенов/эпитопов одной мультиспецифичной молекулой упрощает разработку новых лекарственных средств, поскольку терапия ограничена одной молекулой. Это также проще для пациентов и медицинских работников в сравнении с применением комбинаций двух или более моноспецифичных молекул.

Биспецифичные антитела (BsAb) или мультиспецифичные молекулы общеизвестны в данной области. Первоначальные попытки получения биспецифичных антител включали химическую конъюгацию двух существующих молекул IgG, двух Fab'- или двух (Fab')₂-фрагментов с использованием бифункциональных сопрягающих реагентов. Тем не менее, у таких химически конъюгированных BsAb есть свои ограничения, включая трудоемкость получения биспецифичных молекул, трудности очистки гетеродимеров и удаления гомодимеров и исходных моноклональных антител, а также низкий выход.

Другим типом молекул BsAb является гибридная гибридома или квадрома, полученная соматической гибридизацией двух гибридных клеток, секретирующих разные антитела. Из-за случайного спаривания тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов лишь приблизительно одна десятая часть возможной смеси спаренных IgG содержит функциональные BsAb, что усложняет очистку и снижает выход.

В WO 2013/060867 описан способ крупномасштабного получения гетеродимерных биспецифичных антител восстановлением двух смешиваемых гомодимерных иммуноглобулинов, которое приводит к обмену Fab-фрагментами, усиленному введением асимметричных мутаций в домены CH3 гомодимеров, с последующим обратным окислением межцепочечных дисульфидных связей.

В WO 2009/089004 раскрыт способ получения гетеродимерного белка введением мутации по одной или более чем одной заряженной аминокислоте на линии соприкосновения CH3-CH3, что электростатически препятствует образованию гомодимеров, но электростатически способствует образованию гетеродимеров.

В US 5173168 описан способ получения гетеродимерных IgG с применением метода "выступы во впадины" ("knobs-into-holes"). Сначала создают "выступ" на линии соприкосновения доменов CH3 первой цепи посредством замены аминокислоты с меньшей боковой цепью на аминокислоту с большей боковой цепью и "впадину" на линии соприкосновения доменов CH3 второй цепи посредством замены аминокислоты с большей боковой цепью на аминокислоту с меньшей боковой цепью. Взаимодействие "выступа и впадины" способствует образованию гетеродимерных IgG и препятствует образованию гомодимеров.

В WO 2012/058768 раскрыт способ получения гетеродимерного IgG в результате мутаций, введенных в домен CH3 IgG1, включая отрицательный и положительный дизайн, а также методики конструирования белков на основе структурного и компьютерного моделирования.

Неонатальный Fc-рецептор, FcRn, содержит одну трансмембранную тяжелую цепь (субъединица P51, α -цепь) и одну растворимую легкую цепь (субъединица P14, β -цепь), удерживаемые друг рядом с другом нековалентными взаимодействиями, и по структуре гомологичен семейству гетеродимерных рецепторов главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, MHC) класса I. FcRn выполняет ряд важных биологических функций. В качестве рецептора-переносчика FcRn связывается с IgG и альбумином и проникает через множество клеточных барьеров. Например, FcRn осуществляет перенос материнских антител IgG плоду, обеспечивая неонатальный гуморальный иммунитет во время беременности. pH-зависимое взаимодействие FcRn с IgG и альбумином критически важно для увеличения периода полувыведения из сыворотки посредством рециркуляции и меньшей деградации белка, как раскрыто в Adv Drug Deliv Rev. 2015 Aug 30; 91:109-24; J Immunol. 2015 May 15; 194 (10):4595-603; и Nat Rev Immunol. 2007 Sep; 7(9):715-25. Сайт связывания FcRn и IgG расположен на линии соприкосновения доменов CH2 и CH3 и включает аминокислотные остатки 253, 310 и 435, как раскрыто в Immunol Rev. 2015 Nov; 268(1):253-68 и Mol Immunol. 2015 Oct; 67 (2 Pt A): 131-41.

IV. Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к гетеродимерным иммуноглобулиновым конструкциям, например, биспецифичным антителам, имеющим модифицированные константные области, что повышает стабильность и специфичность, а также к способам их получения и применения.

Соответственно в первом аспекте настоящее изобретение направлено на гетеродимер, содержащий элемент, связывающийся с Fc-рецептором (FcR), и одну или более чем одну распознающую группировку, ковалентно связанную с элементом, связывающимся с FcR. Элемент, связывающийся с FcR, содержит первый полипептид и второй полипептид, соединенные друг с другом одной или более чем одной дисульфидной связью. Каждый из первого полипептида и второго полипептида содержит по меньшей мере часть константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Первый полипептид и второй полипептид содержат по меньшей мере пять аминокислотных замен в следующих положениях:

- 1) 366 и 399 в первом полипептиде и 351, 407 и 409 во втором полипептиде; или
- 2) 366 и 409 в первом полипептиде и 351, 399 и 407 во втором полипептиде; благодаря чему первый и второй полипептиды имеют более высокую склонность к димеризации друг с другом, чем сами с собой.

В некоторых воплощениях по меньшей мере пять аминокислотных замен включают по меньшей мере одну из следующих замен:

- a) глицин, тирозин, валин, пролин, аспартат, глутамат, лизин или триптофан вместо L351 во втором полипептиде;
- b) лейцин, пролин, триптофан или валин вместо T366 в первом полипептиде;
- c) цистеин, аспарагин, изолейцин, глицин, аргинин, треонин или аланин вместо D399 в первом полипептиде и/или втором полипептиде;
- d) лейцин, аланин, пролин, фенилаланин, треонин или гистидин вместо Y407 во втором полипептиде;
- e) цистеин, пролин, серин, фенилаланин, валин, глутамат или аргинин вместо K409 в первом полипептиде и/или втором полипептиде.

В некоторых воплощениях по меньшей мере пять аминокислотных замен включают любую из следующих комбинаций любого элемента каждой из группы I (a)-(h) и группы II (a)-(h):

группа I:

- a) T366L в первом полипептиде и L351E, Y407L во втором полипептиде;
- b) T366L в первом полипептиде и L351G, Y407L во втором полипептиде;
- c) T366L в первом полипептиде и L351Y, Y407A во втором полипептиде;
- d) T366P в первом полипептиде и L351V, Y407P во втором полипептиде;
- e) T366W в первом полипептиде и L351D, Y407P во втором полипептиде;
- f) T366P в первом полипептиде и L351P, Y407F во втором полипептиде;
- g) T366V в первом полипептиде и L351K, Y407T во втором полипептиде; и
- h) T366L в первом полипептиде и L351W, Y407H во втором полипептиде;

группа II:

- a) D399R в первом полипептиде и K409V во втором полипептиде;
- b) D399C в первом полипептиде и K409C во втором полипептиде;
- c) D399C в первом полипептиде и K409P во втором полипептиде;
- d) D399N в первом полипептиде и K409S во втором полипептиде;
- e) D399G в первом полипептиде и K409S во втором полипептиде;
- f) D399I в первом полипептиде и K409F во втором полипептиде;
- g) D399T в первом полипептиде и K409Q во втором полипептиде; и
- h) D399A в первом полипептиде и K409R во втором полипептиде.

В некоторых воплощениях по меньшей мере пять аминокислотных замен включают любую из следующих комбинаций любого элемента каждой из группы III (a)-(h) и группы IV (a)-(h):

группа III:

- a) T366L в первом полипептиде и L351E, Y407L во втором полипептиде;
- b) T366L в первом полипептиде и L351G, Y407L во втором полипептиде;
- c) T366L в первом полипептиде и L351Y, Y407A во втором полипептиде;
- d) T366P в первом полипептиде и L351V, Y407P во втором полипептиде;
- e) T66W в первом полипептиде и L351D, Y407P во втором полипептиде;
- f) T366P в первом полипептиде и L351P, Y407F во втором полипептиде;
- g) T366V в первом полипептиде и L351K, Y407T во втором полипептиде; и
- h) T366L в первом полипептиде и L351W, Y407H во втором полипептиде;

группа IV:

- a) K409V в первом полипептиде и D399R во втором полипептиде;
- b) K409C в первом полипептиде и D399C во втором полипептиде;
- c) K409P в первом полипептиде и D399C во втором полипептиде;
- d) K409S в первом полипептиде и D399N во втором полипептиде;
- e) K409S в первом полипептиде и D399G во втором полипептиде;
- f) K409F в первом полипептиде и D399I во втором полипептиде;

g) K409Q в первом полипептиде и D399T во втором полипептиде; и

h) K409R в первом полипептиде и D399A во втором полипептиде.

В некоторых воплощениях по меньшей мере пять аминокислотных замен включают любой из следующих элементов группы V(a)-(h):

группа V:

a) T366L и D399R в первом полипептиде и L351E, Y407L и K409V во втором полипептиде;

b) T366L и D399C в первом полипептиде и L351G, Y407L и K409C во втором полипептиде;

c) T366L и D399S в первом полипептиде и L351Y, Y407A и K409P во втором полипептиде;

d) T366P и D399N в первом полипептиде и L351V, Y407P и K409S во втором полипептиде;

e) T366W и D399G в первом полипептиде и L351D, Y407P и K409S во втором полипептиде;

f) T366P и D399I в первом полипептиде и L351P, Y407F и K409F во втором полипептиде;

g) T366V и D399T в первом полипептиде и L351K, Y407T и K409Q во втором полипептиде; и

h) T366L и D399A в первом полипептиде и L351W, Y407H и K409R во втором полипептиде.

В некоторых воплощениях по меньшей мере пять аминокислотных замен включают любой из следующих элементов группы VI(a)-(h):

группа VI:

a) T366L и K409V в первом полипептиде и L351E, Y407L и D399R во втором полипептиде;

b) T366L и K409C в первом полипептиде и L351G, Y407L и D399C во втором полипептиде;

c) T366L и K409P в первом полипептиде и L351Y, Y407A и D399C во втором полипептиде;

d) T366P и K409S в первом полипептиде и L351V, Y407P и D399N во втором полипептиде;

e) T366W и K409S в первом полипептиде и L351D, Y407P и D399G во втором полипептиде;

f) T366P и K409F в первом полипептиде и L351P, Y407F и D399I во втором полипептиде;

g) T366V и K409Q в первом полипептиде и L351K, Y407T и D399T во втором полипептиде; и

h) T366L и K409R в первом полипептиде и L351W, Y407H и D399A во втором полипептиде.

В некоторых воплощениях по меньшей мере пять аминокислотных замен включают T366L и D399R в первом полипептиде. В некоторых воплощениях по меньшей мере пять аминокислотных замен включают L351E, Y407L и K409V во втором полипептиде. В некоторых воплощениях по меньшей мере пять аминокислотных замен включают T366L и D399R в первом полипептиде и L351E, Y407L и K409V во втором полипептиде.

В некоторых воплощениях элемент, связывающийся с FcR, содержит Fc-домен. В некоторых воплощениях Fc-домен имеет происхождение от Fc-домена IgG. В некоторых воплощениях Fc-домен имеет происхождение от одного из Fc-домена IgG1, Fc-домена IgG2, Fc-домена IgG3 и Fc-домена IgG4.

В некоторых воплощениях элемент, связывающийся с FcR, способен специфично связываться с Fc-рецептором. В некоторых воплощениях Fc-рецептор представляет собой неонатальный Fc-рецептор (FcRn). В некоторых воплощениях Fc-рецептор представляет собой одно из FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB1, FcγRIIB2, FcγRIIA, FcγRIIB, FcεRI, FcεRII, FcαRI, Fcα/μR, FcRn и их комбинаций. В некоторых воплощениях связывание с Fc-рецептором запускает антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC).

В некоторых воплощениях последовательность по меньшей мере одного из первого полипептида и второго полипептида содержит одну из SEQ ID NO: 16-31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 48, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 68, 69, 70 и 71.

В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка, ковалентно связанная с элементом, связывающимся с FcR, содержит по меньшей мере одно из антигенсвязывающего (Fab) фрагмента или фрагментов, одноцепочечного вариабельного фрагмента или фрагментов (scFv), внеклеточных доменов мембранных рецепторов, пептидных лигандов клеточных мембранных рецепторов, цитокинов и аффинных меток. В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка содержит Fab-фрагмент и scFv-фрагмент. В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка содержит два scFv-фрагмента. В некоторых воплощениях два scFv-фрагмента неидентичны. В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка содержит два Fab-фрагмента. В некоторых воплощениях два Fab-фрагмента неидентичны. В некоторых воплощениях гетеродимеры содержат иммуноглобулиноподобные (Ig-подобные) молекулы, имеющие два неидентичных Fab-фрагмента.

В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка распознает HER2. В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка распознает PD-L1. В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка распознает Trop-2. В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка распознает CD3. В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка распознает CD20.

В некоторых воплощениях распознавание включает специфичное связывание. В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка специфично связывается с HER2. В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка специфично связывается с PD-L1. В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка специфично связыва-

вается с Tgp-2. В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка специфично связывается с CD3. В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка специфично связывается с CD20.

В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка содержит пару распознающих группировок, выбранную из группы VII(a)-(d) ниже:

группа VII:

- a) Fab, специфично связывающийся с HER2, и scFv, специфично связывающийся с CD3;
- b) Fab, специфично связывающийся с Tgp-2, и scFv, специфично связывающийся с CD3;
- c) Fab, специфично связывающийся с CD20, и scFv, специфично связывающийся с CD3; и
- d) Fab, специфично связывающийся с PD-L1, и scFv, специфично связывающийся с CD3.

В некоторых воплощениях одна или более чем одна распознающая группировка содержит Fab, специфично связывающийся с HER2, и Fab, специфично связывающийся с CD20.

В некоторых воплощениях гетеродимеры содержат неидентичные первые тяжелые цепи, неидентичные вторые тяжелые цепи, неидентичные первые легкие цепи и неидентичные вторые легкие цепи.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на способ получения гетеродимера. В некоторых воплощениях способ включает следующие стадии: 1) экспрессию одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей первый полипептид, в первой клетке-хозяине и одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей второй полипептид, во второй клетке-хозяине, где первая клетка-хозяин и вторая клетка-хозяин отделены друг от друга; 2) восстановление первого полипептида и второго полипептида, когда они разделены; 3) смешивание первого полипептида и второго полипептида с получением смеси; 4) окисление полученной смеси; и 5) выделение образованного гетеродимера.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на способ получения гетеродимера, содержащего бивалентный гетерологичный иммуноглобулин, имеющий неидентичные первую тяжелую цепь и вторую тяжелую цепь и неидентичные первую легкую цепь и вторую легкую цепь. В некоторых воплощениях способ включает следующие стадии: 1) экспрессию одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, в первой клетке-хозяине и одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, во второй клетке-хозяине, где первая клетка-хозяин и вторая клетка-хозяин отделены друг от друга; 2) восстановление первой тяжелой цепи и первой легкой цепи совместно и второй тяжелой цепи и второй легкой цепи совместно; 3) объединение первой тяжелой цепи, первой легкой цепи, второй тяжелой цепи и второй легкой цепи с получением смеси; 4) окисление полученной смеси; и 5) выделение образованного гетеродимера. В некоторых воплощениях первая тяжелая цепь и вторая тяжелая цепь образуют Fc-область бивалентного гетерологичного иммуноглобулина.

В некоторых воплощениях Fc-область содержит по меньшей мере пять аминокислотных замен, включающих любую из следующих комбинаций любого элемента каждой из группы VIII (a)-(h) и группы IX (a)-(h):

группа VIII:

- a) T366L в первой тяжелой цепи и L351E, Y407L во второй тяжелой цепи;
- b) T366L в первой тяжелой цепи и L351G, Y407L во второй тяжелой цепи;
- c) T366L в первой тяжелой цепи и L351Y, Y407A во второй тяжелой цепи;
- d) T366P в первой тяжелой цепи и L351V, Y407P во второй тяжелой цепи;
- e) T366W в первой тяжелой цепи и L351D, Y407P во второй тяжелой цепи;
- f) T366P в первой тяжелой цепи и L351P, Y407F во второй тяжелой цепи;
- g) T366V в первой тяжелой цепи и L351K, Y407T во второй тяжелой цепи; и
- h) T366L в первой тяжелой цепи и L351W, Y407N во второй тяжелой цепи;

группа IX:

- a) D399R в первой тяжелой цепи и K409V во второй тяжелой цепи;
- b) D399C в первой тяжелой цепи и K409C во второй тяжелой цепи;
- c) D399C в первой тяжелой цепи и K409P во второй тяжелой цепи;
- d) D399N в первой тяжелой цепи и K409S во второй тяжелой цепи;
- e) D399G в первой тяжелой цепи и K409S во второй тяжелой цепи;
- f) D399I в первой тяжелой цепи и K409F во второй тяжелой цепи;
- g) D399T в первой тяжелой цепи и K409Q во второй тяжелой цепи; и
- h) D399A в первой тяжелой цепи и K409R во второй тяжелой цепи.

В некоторых воплощениях по меньшей мере пять аминокислотных замен включают любой из следующих элементов группы X (a)-(h):

группа X:

- a) T366L и D399R в первой тяжелой цепи и L351E, Y407L и K409V во второй тяжелой цепи;
- b) T366L и D399C в первой тяжелой цепи и L351G, Y407L и K409C во второй тяжелой цепи;
- c) T366L и D399C в первой тяжелой цепи и L351Y, Y407A и K409P во второй тяжелой цепи;
- d) T366P и D399N в первой тяжелой цепи и L351V, Y407P и K409S во второй тяжелой цепи;
- e) T366W и D399G в первом полипептиде и L351D, Y407P и K409S во второй тяжелой цепи;

- f) T366P и D399I в первом полипептиде и L351P, Y407F и K409F во второй тяжелой цепи;
- g) T366V и D399T в первой тяжелой цепи и L351K, Y407T и K409Q во второй тяжелой цепи; и
- h) T366L и D399A в первой тяжелой цепи и L351W, Y407H и K409R во второй тяжелой цепи.

В некоторых воплощениях по меньшей мере пять аминокислотных замен включают любой из следующих элементов группы XI (a)-(h):

группа XI:

- a) T366L и K409V в первой тяжелой цепи и L351E, Y407L и D399R во второй тяжелой цепи;
- b) T366L и K409C в первой тяжелой цепи и L351G, Y407L и D399C во второй тяжелой цепи;
- c) T366L и K409P в первой тяжелой цепи и L351Y, Y407A и D399C во второй тяжелой цепи;
- d) T366P и K409S в первой тяжелой цепи и L351V, Y407P и D399N во второй тяжелой цепи;
- e) T366W и K409S в первой тяжелой цепи и L351D, Y407P и D399G во второй тяжелой цепи;
- f) T366P и K409F в первой тяжелой цепи и L351P, Y407F и D399I во второй тяжелой цепи;
- g) T366V и K409Q в первой тяжелой цепи и L351K, Y407T и D399T во второй тяжелой цепи; и
- h) T366L и K409R в первой тяжелой цепи и L351W, Y407H и D399A во второй тяжелой цепи.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на способ получения гетеродимера, содержащего иммуноглобулиновый гетеродимер, содержащий неидентичные первую тяжелую цепь и вторую тяжелую цепь и неидентичные первую легкую цепь и вторую легкую цепь. В некоторых воплощениях способ включает следующие стадии: 1) экспрессию одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, в первой клетке-хозяине и одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, во второй клетке-хозяине, где первая клетка-хозяин и вторая клетка-хозяин отделены друг от друга; 2) восстановление первой тяжелой цепи и первой легкой цепи совместно и второй тяжелой цепи и второй легкой цепи совместно; 3) объединение первой тяжелой цепи, первой легкой цепи, второй тяжелой цепи и второй легкой цепи с получением смеси; 4) окисление полученной смеси; и 5) выделение образованного гетеродимера. В некоторых воплощениях первая тяжелая цепь и вторая тяжелая цепь образуют Fc-область бивалентного гетерологичного иммуноглобулина.

В некоторых воплощениях Fc-домен содержит по меньшей мере пять аминокислотных замен, включающих любую из следующих комбинаций любого элемента каждой из группы XII (a)-(h) и группы XIII (a)-(h):

группа XII:

- a) T366L в первой тяжелой цепи и L351E, Y407L во второй тяжелой цепи;
- b) T366L в первой тяжелой цепи и L351G, Y407L во второй тяжелой цепи;
- c) T366L в первой тяжелой цепи и L351Y, Y407A во второй тяжелой цепи;
- d) T366P в первой тяжелой цепи и L351V, Y407P во второй тяжелой цепи;
- e) T366W в первой тяжелой цепи и L351D, Y407P во второй тяжелой цепи;
- f) T366P в первой тяжелой цепи и L351P, Y407F во второй тяжелой цепи;
- g) T366V в первой тяжелой цепи и L351K, Y407T во второй тяжелой цепи; и
- h) T366L в первой тяжелой цепи и L351W, Y407H во второй тяжелой цепи;

группа XIII:

- a) K409V в первой тяжелой цепи и D399R во второй тяжелой цепи;
- b) K409C в первой тяжелой цепи и D399C во второй тяжелой цепи;
- c) K409P в первой тяжелой цепи и D399C во второй тяжелой цепи;
- d) K409S в первой тяжелой цепи и D399N во второй тяжелой цепи;
- e) K409S в первой тяжелой цепи и D399G во второй тяжелой цепи;
- f) K409F в первой тяжелой цепи и D399I во второй тяжелой цепи;
- g) K409Q в первой тяжелой цепи и D399T во второй тяжелой цепи; и
- h) K409R в первой тяжелой цепи и D399A во второй тяжелой цепи.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на способ получения гетеродимера, содержащего бивалентный гетерологичный белок, содержащий тяжелую цепь, легкую цепь и scFv-фрагмент, связанный с Fc-цепью, где часть тяжелой цепи и Fc-цепи, связанной с scFv-фрагментом, образуют Fc-область. В некоторых воплощениях способ включает следующие стадии: 1) экспрессию одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь и легкую цепь, и одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей scFv-фрагмент, связанный с Fc-цепью, в клетке-хозяине; и 2) выделение образованного гетеродимера.

В некоторых воплощениях Fc-область содержит по меньшей мере пять аминокислотных замен, включающих любую из следующих комбинаций любого элемента каждой из группы XIV (a)-(h) и группы XV (a)-(h):

группа XIV:

- a) T366L в первой тяжелой цепи и L351E, Y407L во второй тяжелой цепи;
- b) T366L в первой тяжелой цепи и L351G, Y407L во второй тяжелой цепи;
- c) T366L в первой тяжелой цепи и L351Y, Y407A во второй тяжелой цепи;
- d) T366P в первой тяжелой цепи и L351V, Y407P во второй тяжелой цепи;

- e) T366W в первой тяжелой цепи и L351D, Y407P во второй тяжелой цепи;
- f) T366P в первой тяжелой цепи и L351P, Y407F во второй тяжелой цепи;
- g) T366V в первой тяжелой цепи и L351K, Y407T во второй тяжелой цепи; и
- h) T366L в первой тяжелой цепи и L351W, Y407H во второй тяжелой цепи;

группа XV:

- a) D399R в первой тяжелой цепи и K409V во второй тяжелой цепи;
- b) D399C в первой тяжелой цепи и K409C во второй тяжелой цепи;
- c) D399S в первой тяжелой цепи и K409P во второй тяжелой цепи;
- d) D399N в первой тяжелой цепи и K409S во второй тяжелой цепи;
- e) D399G в первой тяжелой цепи и K409S во второй тяжелой цепи;
- f) D399I в первой тяжелой цепи и K409F во второй тяжелой цепи;
- g) D399T в первой тяжелой цепи и K409Q во второй тяжелой цепи; и
- h) D399A в первой тяжелой цепи и K409R во второй тяжелой цепи.

В некоторых воплощениях по меньшей мере пять аминокислотных замен включают любую из следующих комбинаций любого элемента каждой из группы XVI (a)-(h) и группы XVII (a)-(h):

группа XVI:

- a) T366L в первой тяжелой цепи и L351E, Y407L во второй тяжелой цепи;
- b) T366L в первой тяжелой цепи и L351G, Y407L во второй тяжелой цепи;
- c) T366L в первой тяжелой цепи и L351Y, Y407A во второй тяжелой цепи;
- d) T366P в первой тяжелой цепи и L351V, Y407P во второй тяжелой цепи;
- e) T366W в первой тяжелой цепи и L351D, Y407P во второй тяжелой цепи;
- f) T366P в первой тяжелой цепи и L351P, Y407F во второй тяжелой цепи;
- g) T366V в первой тяжелой цепи и L351K, Y407T во второй тяжелой цепи; или
- h) T366L в первой тяжелой цепи и L351W, Y407H во второй тяжелой цепи;

группа XVII:

- a) K409V в первой тяжелой цепи и D399R во второй тяжелой цепи;
- b) K409C в первой тяжелой цепи и D399C во второй тяжелой цепи;
- c) K409P в первой тяжелой цепи и D399S во второй тяжелой цепи;
- d) K409S в первой тяжелой цепи и D399N во второй тяжелой цепи;
- e) K409S в первой тяжелой цепи и D399G во второй тяжелой цепи;
- f) K409F в первой тяжелой цепи и D399I во второй тяжелой цепи;
- g) K409Q в первой тяжелой цепи и D399T во второй тяжелой цепи; и
- h) K409R в первой тяжелой цепи и D399A во второй тяжелой цепи.

В некоторых воплощениях аспектов, относящихся к способам получения гетеродимера, нуклеиновые кислоты расположены на векторе или в системе векторов. В некоторых воплощениях вектор или система векторов включает плазмидный вектор (векторы) pX0GC, полученный модификацией вектора (векторов) pCDNA.

В некоторых воплощениях аспектов, относящихся к способам получения гетеродимера, клетки-хозяева включают клетки эмбриональной почки человека (НЕК293) или НЕК293Т, НЕК293Е, НЕК293F, полученные модификацией клеток НЕК293, клетки яичника китайского хомячка (СНО) или СНО-S, СНО-dhfr⁻, СНО/DG44, ExpiСНО, полученные модификацией клеток СНО, и их комбинации.

В некоторых воплощениях аспектов, относящихся к способам получения гетеродимера, стадии, включающие восстановление, включают один или более чем один восстановитель, содержащий по меньшей мере одно из 2-аминоэтантанола, дитиотреитола, гидрохлорида трис(2-карбоксиэтил)фосфина, их химических производных и их комбинаций. В некоторых воплощениях способы дополнительно включают восстановление при приблизительно 2-8°C, например, 3-6°C и 4°C, возможно, на протяжении периода времени продолжительностью по меньшей мере приблизительно 3 ч (например, 3-8 ч, 4-7 ч и 5-6 ч). В других воплощениях способы включают удаление одного или более чем одного восстановителя. В некоторых воплощениях удаление одного или более чем одного восстановителя включает метод обес-соливания.

В некоторых воплощениях аспектов, относящихся к способам получения гетеродимера, стадии, включающие окисление, включают один или более чем один окислитель, содержащий по меньшей мере одно из L-дегидроаскорбиновой кислоты, ее химических производных и их комбинаций. В некоторых воплощениях способы дополнительно включают окисление при приблизительно 2-8°C, например, 3-6°C и 4°C, возможно, на протяжении периода времени продолжительностью по меньшей мере приблизительно 5 ч (например, от 5 ч до 4 суток, от 5 ч до 3 суток, от 5 ч до 1 суток). В некоторых воплощениях способ дополнительно включает выделение и/или очистку.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на нуклеиновые кислоты, кодирующие часть гетеродимера по любому аспекту настоящего изобретения. В некоторых воплощениях последовательность нуклеиновой кислоты содержит одну из SEQ ID NO: 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 47, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62 и 64-67, или последовательность, по меньшей мере на 70%, например, по меньшей мере на 75,

80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8% или по меньшей мере на 99,9%, идентичную одной или более из SEQ ID NO: 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 47, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62 и 64-67. В некоторых воплощениях последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, которая будет гибридизоваться с одной или более из SEQ ID NO: 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 47, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62 и 64-67 в жестких условиях. В некоторых воплощениях последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, комплементарную одной или более из SEQ ID NO: 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 47, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62 и 64-67.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на вектор или систему векторов, содержащую по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, кодирующую часть гетеродимера по любому аспекту настоящего изобретения. В некоторых воплощениях вектор или система векторов включает плазмидный вектор (векторы) pX0GC, полученный модификацией вектора (векторов) pCDNA.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на клетку-хозяина, содержащую вектор или систему векторов, содержащую любую нуклеиновую кислоту, кодирующую часть гетеродимера по любому аспекту настоящего изобретения. В некоторых воплощениях клетка-хозяин представляет собой одно из клеток эмбриональной почки человека (HEK293) или HEK293T, HEK293E, HEK293F, полученных модификацией клеток HEK293, клеток яичника китайского хомячка (CHO) или CHO-S, CHO-dhfr^r, CHO/DG44, ExpiCHO, полученных модификацией клеток CHO.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на способ рекомбинантного получения части гетеродимера по любому аспекту настоящего изобретения. В некоторых воплощениях способ включает обеспечение клетки-хозяина, содержащей вектор или систему векторов, содержащую одну или более чем одну нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере первую тяжелую цепь и вторую тяжелую цепь гетеродимера по любому аспекту настоящего изобретения, экспрессию нуклеиновых кислот и выделение рекомбинантно полученного гетеродимера.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на композицию, содержащую гетеродимер, описанный выше, и фармацевтически приемлемый носитель, консервант или эксципиент.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на способ введения гетеродимера, описанного выше, субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых воплощениях гетеродимер вводят субъекту для лечения заболевания или состояния. В других воплощениях гетеродимер вводят субъекту для предотвращения заболевания или состояния. В некоторых воплощениях субъект представляет собой млекопитающего. В некоторых воплощениях субъект представляет собой человека.

В некоторых воплощениях заболевание или состояние включает по меньшей мере одно из аутоиммунных заболеваний, иммунного ответа против трансплантатов, аллергических реакций, инфекций, нейродегенеративных заболеваний, опухолевых заболеваний и клеточных пролиферативных расстройств или их комбинации. В некоторых воплощениях аутоиммунные заболевания включают по меньшей мере одно из артрита, ревматоидного артрита, псориаза, рассеянного склероза (РС), язвенного колита, болезни Крона, системной красной волчанки (СКВ), гломерулонефрита, заболеваний наподобие дилатационной кардиомиопатии, синдрома Шегрена, аллергического контактного дерматита, полимиозита, склеродермии, узелкового периартериита, ревматизма, витилиго, инсулинозависимого сахарного диабета, синдрома Бехчета, хронического тиреоидита и их комбинаций. В некоторых воплощениях нейродегенеративные заболевания включают по меньшей мере одно из болезни Паркинсона, болезни Гентингтона, болезни Мачадо-Джозефа, бокового амиотрофического склероза (БАС), болезни Крейтцфельда-Якоба и их комбинаций. В некоторых воплощениях опухолевые заболевания и клеточные пролиферативные расстройства включают по меньшей мере одно из лейкоза, лимфомы, миеломы, опухолей головного мозга, плоскоклеточного рака головы и шеи, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака носоглотки, рака пищевода, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака печени, колоректального рака, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака эндометрия, саркомы матки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, почечноклеточного рака, меланомы и их комбинаций.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на гетеродимер, как описано выше, для применения в медицине.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на гетеродимер для применения в лечении заболевания или состояния. В некоторых воплощениях заболевание или состояние включает по меньшей мере одно из аутоиммунных заболеваний, иммунного ответа против трансплантатов, аллергических реакций, инфекций, нейродегенеративных заболеваний, опухолевых заболеваний и клеточных пролиферативных расстройств или их комбинации.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на применение гетеродимера, как описано выше, для изготовления лекарственного средства.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на применение гетеродимера, как описано выше, для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания или состояния. В некоторых воплощениях гетеродимер представляет собой гетеродимер по любому аспекту настоящего изобретения. В некоторых воплощениях заболевание или состояние включает по меньшей мере одно из аутоиммунных заболеваний, иммунного ответа против трансплантатов, аллергических реакций, инфекций, нейроде-

генеративных заболеваний, опухолевых заболеваний и клеточных пролиферативных расстройств или их комбинации.

V. Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлен типичный вектор pDis3. Cmv представляет собой цитомегаловирусный промотор, sr представляет собой сигнальный пептид, SUMO представляет собой метку малого убиквитин-подобного модификатора (Small Ubiquitin-related Modifier), Fc представляет собой кристаллизуемый фрагмент, BGH представляет собой сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (bgh-PolyA), HA представляет собой гемагглютинин вируса гриппа человека, PUC ori представляет собой репликатор pUC, Hydro представляет собой ген резистентности к гигромицину B, AmpR представляет собой ген резистентности к ампициллину, oriP представляет собой репликатор вируса Эпштейна-Барр.

На фиг. 2 представлена структура библиотеки гетеродимеров Fc.

На фиг. 3 представлено спаривание с образованием гомодимеров и гетеродимера.

На фиг. 4 представлена общая структура гетеродимера "антитело против HER2/scFv против CD3".

На фиг. 5 представлен пик элюирования гетеродимера "антитело против HER2/scFv против CD3".

На фиг. 6 представлен SDS-PAGE-анализ гетеродимера "антитело против HER2/scFv против CD3".

На фиг. 7 представлен анализ чистоты гетеродимера "антитело против HER2/scFv против CD3".

На фиг. 8A и B представлена стабильность гетеродимера "антитело против HER2/scFv против CD3" в различных концентрациях: 10 мг/мл, 40°C (фиг. 8A), 1 мг/мл, 40°C (фиг. 8B).

На фиг. 9 представлена аффинность связывания гетеродимера "антитело против HER2/scFv против CD3" с FcRn.

На фиг. 10A, B, C и D представлено одновременное связывание гетеродимера "антитело против HER2/scFv против CD3" с клетками SK-BR-3 и Jurkat: изотипический контроль (фиг. 10A), mAb против HER2 (фиг. 10B), тетравалентное гомодимерное BsAb против HER2/CD3 (фиг. 10C), бивалентное гетеродимерное BsAb против HER2/CD3 (фиг. 10D).

На фиг. 11A и B представлена цитотоксичность гетеродимера "антитело против HER2/scFv против CD3" in vitro в отношении различных клеток-мишеней: SK-BR-3 (фиг. 11A), BT-474 (фиг. 11B).

На фиг. 12 представлен фармакокинетический (ФК) профиль гетеродимера "антитело против HER2/scFv против CD3" после однократного внутривенного введения.

На фиг. 13 представлен SDS-PAGE-анализ гетеродимера "антитело против Троп-2/scFv против CD3".

На фиг. 14 представлена аффинность связывания гетеродимера "антитело против Троп-2/scFv против CD3" с Троп-2.

На фиг. 15A, B, C и D представлено одновременное связывание гетеродимера "антитело против Троп-2/scFv против CD3" с клетками ВхРС-3 и Jurkat: изотипический контроль (фиг. 15A), mAb против CD3 (фиг. 15B), mAb против Троп-2 (фиг. 15C), гетеродимерное BsAb против Троп-2/CD3 (фиг. 15D).

На фиг. 16A и B представлена цитотоксичность гетеродимера "антитело против Троп-2/scFv против CD3" in vitro: H1650 (фиг. 16A) и ВхРС-3 (фиг. 16B).

На фиг. 17 представлен фармакокинетический (ФК) профиль гетеродимера "антитело против Троп-2/scFv против CD3" после однократного внутривенного введения.

На фиг. 18 представлен SDS-PAGE-анализ гетеродимера "антитело против CD20/scFv против CD3".

На фиг. 19A и B представлена стабильность гетеродимера "антитело против CD20/scFv против CD3" в различных концентрациях: 10 мг/мл, 40°C (фиг. 19A), 1 мг/мл, 40°C (фиг. 19B).

На фиг. 20 представлен SDS-PAGE-анализ гетеродимера "антитело против PD-L1/scFv против CD3".

На фиг. 21 представлена аффинность связывания гетеродимера "антитело против PD-L1/scFv против CD3" с PD-L1.

На фиг. 22A, B, C и D представлено одновременное связывание гетеродимера "антитело против PD-L1/scFv против CD3" с клетками H460 и Jurkat: изотипический контроль (фиг. 22A), mAb против PD-L1 (фиг. 22B), mAb против CD3 (фиг. 22C), гетеродимерное BsAb против PD-L1/CD3 (фиг. 22D).

На фиг. 23A и B представлена цитотоксичность гетеродимера "антитело против PD-L1/scFv против CD3" in vitro в отношении различных клеток: HCC827 (фиг. 23A), H1650 (фиг. 23B).

На фиг. 24 представлен пик элюирования продуктов экспрессии антитела против CD20.

На фиг. 25 представлена общая структура гетеродимера "антитело против HER2/антитело против CD20".

На фиг. 26 представлена общая структура полумера.

На фиг. 27 представлен SDS-PAGE-анализ продукта восстановления.

На фиг. 28 представлен анализ продукта восстановления эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографией (Size Exclusion-High Performance Liquid Chromatography, SEC-HPLC).

На фиг. 29 представлен SDS-PAGE-анализ продукта окисления.

На фиг. 30 представлен пик элюирования гетеродимера "антитело против HER2/антитело против CD20".

На фиг. 31 представлен SDS-PAGE-анализ гетеродимера "антитело против HER2/антитело против CD20".

На фиг. 32 представлены результаты анализа чистоты гетеродимера "антитело против HER2/антитело против CD20".

На фиг. 33 представлен анализ гетеродимера "антитело против HER2/антитело против CD20".

На фиг. 34А и В представлен масс-спектр гетеродимера "антитело против HER2/антитело против CD20" (фиг. 34А) и выравнивание соответствующих последовательностей (фиг. 34В). Сплошная линия указывает на то, что аминокислоты идентичны ожидаемым на втором МС, точечная линия указывает на то, что пептиды идентичны ожидаемым на первой МС, а незатененные аминокислоты соответствуют "не обнаруженным".

VI. Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится гетеродимерным иммуноглобулиноподобным конструкциям, например (но не обязательно), биспецифичным антителам, имеющим модифицированные константные области тяжелой цепи (например, Fc-область), придающие конструкциям повышенную стабильность и терапевтическую эффективность. Эти конструкции могут быть получены с сохранением полезных свойств нативных IgG и свободными от несоответствия легких и тяжелых цепей. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам получения иммуноглобулиновых конструкций, обычно посредством реакции восстановления с последующей реакцией окисления двух "полуантител" или "полумеров" с образованием гетеродимера. Гетеродимер по настоящему изобретению можно рассматривать как состоящий из двух таких неидентичных полуантител или полумеров, соединенных друг с другом одной или более чем одной дисульфидной связью. Полумер содержит одну цепь мутантной тяжелой цепи иммуноглобулина или ее фрагмент и связанную с ней распознающую группировку (называемую "когнатной" распознающей группировкой данной цепи), которые в физиологических условиях связаны ковалентной связью. Эти полумеры разработаны так, что они имеют модификации в их константных областях тяжелой цепи, подавляющие образование гомодимеров в восстанавливающих условиях, которые, при отсутствии таких модификаций, обычно способствуют или поддерживают гомодимерное спаривание под действием нековалентных сил, и, в то же время, способствующие гетеродимерному связыванию двух комплементарных разработанных полумеров в тех же восстанавливающих условиях. "Гетеродимерное связывание" подразумевает как нековалентные, так и ковалентные силы связывания. При использовании здесь "полуантитело" или "полумер" могут относиться к молекуле или молекулярному комплексу, который можно рассматривать как содержащий только "половину" полноразмерного иммуноглобулинового гетеротетрамера или производные иммуноглобулина (такие как scFv), то есть он имеет только одну полипептидную цепь из обычных двух, в норме составляющих элемент, связывающийся с Fc-рецептором в типичных физиологических условиях, и одну распознающую группировку, связанную с указанной одной полипептидной цепью. Например, полуантитело или полумер может состоять из тяжелой цепи иммуноглобулина (или ее фрагмента), содержащей определенные мутации, и легкой цепи иммуноглобулина (или ее фрагмента), связанных друг с другом ковалентной связью или нековалентными взаимодействиями, такими гидрофобные силы и водородные связи, и его можно обычно рассматривать как "моновалентное". Или такое "моновалентное" полуантитело или полумер может состоять из одной цепи, содержащей шарнирную область и области C_H2 и C_H3 тяжелой цепи иммуноглобулина с определенными мутациями, связанную, например, ковалентной связью, с распознающей группировкой, не являющейся Fab-фрагментом, например, с одноцепочечным вариабельным фрагментом (scFv) или связывающим доменом рецептора. Типичный "полумер" или "полуантитело", соответствующее первому случаю, показано на фиг. 26, где присутствуют одна тяжелая цепь и одна легкая цепь иммуноглобулина.

Выход получения гетеродимера по настоящему изобретению сходен с выходом нативного антитела, и предложенный способ прост в осуществлении. В одном воплощении, где гетеродимер состоит из двух разных "полуантител", каждое из которых состоит из полноразмерной тяжелой цепи иммуноглобулина, несущей определенные мутации, и полноразмерной легкой цепи иммуноглобулина, обычно проводят раздельную экспрессию полуантител, например, в двух разных клетках, их раздельную очистку, раздельное восстановление добавлением восстановителя, смешивают их друг с другом и затем проводят их окисление с образованием гетеродимера. В другом воплощении, где гетеродимер состоит из двух разных полумеров, один из которых состоит из полноразмерной тяжелой цепи, несущей определенные мутации, и полноразмерной легкой цепи, в то время как другой представляет собой фрагмент тяжелой цепи, связывающийся с FcR, несущий определенные мутации, связанный с распознающей группировкой, не являющейся Fab-фрагментом, гетеродимер по настоящему изобретению может быть экспрессирован и очищен с использованием одной клеточной линии. Типичные восстановители включают, например, 2-аминоэтантол, дитиотреитол, гидрохлорид трис(2-карбоксиэтил)фосфина и другие химические производные, но восстановители не ограничены указанными вариантами. Типичные окислители включают, например, L-дегидроаскорбиновую кислоту и другие химические производные, но окислители не ограничены указанными вариантами.

Гетеродимеры по настоящему изобретению могут характеризоваться пятью конкретными нецис-теиновыми мутациями в доменах CH3 гетеродимеров. Они представляют собой T366, D399, L351, Y407

и K409. Нумерация аминокислотных остатков, использованная здесь, соответствует системе нумерации Kabat EU, например, как описано в Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-8, полностью включенной сюда посредством ссылки. Система нумерации Kabat EU может быть использована, например, для сравнения последовательности целевого антитела с консенсусной последовательностью, определенной по системе нумерации Kabat EU. Исклчительно в качестве примера, пять мутаций могут включать T366L, D399R, L351E, Y407L и K409V. Тем не менее, изобретение не ограничено указанными мутациями. Например, мутация в положении T366 может включать любые из следующих неограничивающих примеров: T366L, T366P, T366C, T366V, T366S, T366R и T366W. Мутация в положении D399 может включать любые из следующих неограничивающих примеров: D399R, D399C, D399H, D399V, D399T, D399A, D399P, D399N, D399I, D399H, D399S, D399G, D399M. Мутация в положении L351 может включать любые из следующих неограничивающих примеров: L351E, L351G, L351R, L351Y, L351T, L351K, L351W, L351V, L351P и L351D. Мутация в положении Y407 может включать любые из следующих неограничивающих примеров: 407L, Y407P, Y407A, Y407R, Y407V, Y407T, Y407H и Y407F. Мутация в положении K409 может включать любые из следующих неограничивающих примеров: K409V, K409C, K409P, K409A, K409F, K409Q, K409R, K409T, K409S, K409M, K409Y и K409N.

В типичных воплощениях мутации в положениях T366 и D399 присутствуют в первом полипептиде, то есть в домене СНЗ первой тяжелой цепи, а мутации в положениях L351, Y407 и K409 присутствуют во втором полипептиде, то есть в домене СНЗ второй тяжелой цепи. Несмотря на то, что изобретение в прямой форме не ограничено этой комбинацией, она обеспечивает оптимальное спонтанное образование гетеродимеров с хорошей стабильностью и связывающей активностью. Каждый полимер значительно более активно взаимодействует со своим комплементарным полимером-"партнером" или цепью-"партнером", и значительно менее активно - с самой собой, что значительно способствует образованию гетеродимера и значительно препятствует образованию гомодимеров. Когда только один из двух полимеров, составляющих гетеродимер, присутствует в водном растворе в физиологических условиях, являющихся в достаточной степени восстанавливающими, фактически присутствующие полипептидные формы могут включать полимерную форму, гомодимерную форму, в которой два полимера удерживаются нековалентными силами, и несвернутые формы. В таком растворе доля полипептидных форм в форме гомодимера значительно уменьшена, при условии, что водный раствор по существу свободен от любых полипептидов, отличных от указанного выше полимера, таких как комплементарный "другой" полимер. Иными словами, когда только одну из первой или второй полипептидной цепи и связанную с ней распознающую группировку ("когнатную" распознающую группировку полипептидной цепи) помещают в водную среду при физиологических условиях, содержащую достаточное количество восстановителя, такая полипептидная цепь и ее когнатная распознающая группировка не имеют тенденции к образованию гомодимеров, а предпочтительно остаются в водном растворе в форме полимера, при условии, что указанный водный раствор по существу свободен от любых других полипептидов. Такой акт помещения в водную среду включает, например, экспрессию в клетке-хозяине. Сходным образом, при помещении обеих из таких двух полипептидных цепей с их когнатными распознающими группировками в водную среду при физиологических условиях, содержащую достаточное количество восстановителя, возможно присутствие соответствующего гетеродимера и составляющих его полимеров, а образование гомодимеров угнетено. Доля гомодимера, образуемого в присутствии восстановителя, обычно составляет менее 50% по массе, исходя из общей массы всех полипептидных форм (полимеров, гомодимеров, гетеродимеров, несвернутых форм и так далее), присутствующих в водном растворе, когда водный раствор по существу свободен от других полипептидов. Например, в присутствии восстановителя доля (по массе) гомодимеров, образованных первым полипептидом, вторым полипептидом, первым полипептидом, ковалентно связанным с распознающей группировкой, или вторым полипептидом, ковалентно связанным с распознающей группировкой, составляет менее 50%. Например, менее 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1% или еще меньше.

В определенных воплощениях восстановитель выбран из группы, состоящей из глутатиона, 2-меркаптоэтанола, 2-меркаптоэтиламина, трис(2-карбоксиэтил)фосфина (ТСЕР), цистеина, гидрохлорида цистеина, дитиотреитола (DTT), цистеиндитиотреитола, дитиобутиламина, дитиозеритрита (DTE), борогидрида натрия (NaBH_4), цианборогидрида натрия (NaCNBH_3) и/или их комбинаций. В некоторых воплощениях молярная концентрация восстановителя может превышать молярную концентрацию белка в 1-100 раз (например, в 20-50 раз). В определенных воплощениях концентрация восстановителя может составлять от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 20 мМ.

Типичные восстановители, которые могут быть использованы в достаточном количестве, включают дитиотреитол в концентрации 1 мМ или выше, 2-меркаптоэтиламин в концентрации 50 мМ или выше и цистеин в концентрации 50 мМ или выше. В некоторых воплощениях восстановитель удаляют после инкубации с белком перед окислением белка.

Первые полипептиды и вторые полипептиды могут быть по отдельности связаны с распознающей группировкой ковалентной связью или гибким линкером, где распознающая группировка включает, без ограничения, антигенсвязывающий фрагмент, одноцепочечный фрагмент антитела (scFv), лиганд, распознающий рецептор, или рецептор, распознающий лиганд. Ковалентная связь включает химическую связь

двух или более атомов с объединением их внешних электронных оболочек. Стабильная химическая структура, образующаяся при достижении этими электронами насыщенного состояния, известна как ковалентная связь. Иными словами, ковалентная связь включает взаимодействие с образованием общих пар электронов у атомов, которые могут принадлежать к одному и тому же элементу или к разным элементам. Ковалентная связь между первыми полипептидами и вторыми полипептидами в настоящем изобретении включает, без ограничения, неамидную связь, синтезированную при взаимодействии аминокислоты с карбоксильной группой другой аминокислоты, приводящем к высвобождению молекулы воды (H_2O), или неамидную связь или амидную связь, синтезированную при взаимодействии этиленгликоля, полиэтиленгликоля или альдегидной группы других соединений и их полимеров с аминокислотной группой молекулы аминокислоты. Гибкий ликер может содержать короткую аминокислотную последовательность или полимер. Такая аминокислотная последовательность включает без ограничения

GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:72).

Объем настоящего изобретения в прямой форме включает другие комбинации мутаций в положениях T366, D399, L351, Y407 и K409. Например, любые из следующих комбинаций (a)-(h) из группы I и группы II:

группа I:

- a) T366L в первом полипептиде и L351E, Y407L во втором полипептиде;
- b) T366L в первом полипептиде и L351G, Y407L во втором полипептиде;
- c) T366L в первом полипептиде и L351Y, Y407A во втором полипептиде;
- d) T366P в первом полипептиде и L351V, Y407P во втором полипептиде;
- e) T366W в первом полипептиде и L351D, Y407P во втором полипептиде;
- f) T366P в первом полипептиде и L351P, Y407F во втором полипептиде;
- g) T366V в первом полипептиде и L351K, Y407T во втором полипептиде; и
- h) T366L в первом полипептиде и L351W, Y407H во втором полипептиде;

группа II:

- a) D399R в первом полипептиде и K409V во втором полипептиде;
- b) D399C в первом полипептиде и K409C во втором полипептиде;
- c) D399C в первом полипептиде и K409P во втором полипептиде;
- d) D399N в первом полипептиде и K409S во втором полипептиде;
- e) D399G в первом полипептиде и K409S во втором полипептиде;
- f) D399I в первом полипептиде и K409F во втором полипептиде;
- g) D399T в первом полипептиде и K409Q во втором полипептиде; и
- h) D399A в первом полипептиде и K409R во втором полипептиде.

Любые из следующих комбинаций (a)-(h) из группы III и группы IV:

группа III:

- a) T366L в первом полипептиде и L351E, Y407L во втором полипептиде;
- b) T366L в первом полипептиде и L351G, Y407L во втором полипептиде;
- c) T366L в первом полипептиде и L351Y, Y407A во втором полипептиде;
- d) T366P в первом полипептиде и L351V, Y407P во втором полипептиде;
- e) T66W в первом полипептиде и L351D, Y407P во втором полипептиде;
- f) T366P в первом полипептиде и L351P, Y407F во втором полипептиде;
- g) T366V в первом полипептиде и L351K, Y407T во втором полипептиде; и
- h) T366L в первом полипептиде и L351W, Y407H во втором полипептиде;

группа IV:

- a) K409V в первом полипептиде и D399R во втором полипептиде;
- b) K409C в первом полипептиде и D399C во втором полипептиде;
- c) K409P в первом полипептиде и D399C во втором полипептиде;
- d) K409S в первом полипептиде и D399N во втором полипептиде;
- e) K409S в первом полипептиде и D399G во втором полипептиде;
- f) K409F в первом полипептиде и D399I во втором полипептиде;
- g) K409Q в первом полипептиде и D399T во втором полипептиде; и
- h) K409R в первом полипептиде и D399A во втором полипептиде.

Любые из следующих элементов (a)-(h) группы V:

группа V:

- a) T366L и D399R в первом полипептиде и L351E, Y407L и K409V во втором полипептиде;
- b) T366L и D399C в первом полипептиде и L351G, Y407L и K409C во втором полипептиде;
- c) T366L и D399C в первом полипептиде и L351Y, Y407A и K409P во втором полипептиде;
- d) T366P и D399N в первом полипептиде и L351V, Y407P и K409S во втором полипептиде;
- e) T366W и D399G в первом полипептиде и L351D, Y407P и K409S во втором полипептиде;
- f) T366P и D399I в первом полипептиде и L351P, Y407F и K409F во втором полипептиде;
- g) T366V и D399T в первом полипептиде и L351K, Y407T и K409Q во втором полипептиде; и
- h) T366L и D399A в первом полипептиде и L351W, Y407H и K409R во втором полипептиде.

Любые из следующих элементов (a)-(h) группы VI:

группа VI:

- a) T366L и K409V в первом полипептиде и L351E, Y407L и D399R во втором полипептиде;
- b) T366L и K409C в первом полипептиде и L351G, Y407L и D399C во втором полипептиде;
- c) T366L и K409P в первом полипептиде и L351Y, Y407A и D399C во втором полипептиде;
- d) T366P и K409S в первом полипептиде и L351V, Y407P и D399N во втором полипептиде;
- e) T366W и K409S в первом полипептиде и L351D, Y407P и D399G во втором полипептиде;
- f) T366P и K409F в первом полипептиде и L351P, Y407F и D399I во втором полипептиде;
- g) T366V и K409Q в первом полипептиде и L351K, Y407T и D399T во втором полипептиде; и
- h) T366L и K409R в первом полипептиде и L351W, Y407H и D399A во втором полипептиде.

Каждый из первого полипептида и второго полипептида может содержать тяжелую цепь. Гетеродимерные конструкции по настоящему изобретению могут содержать биспецифичные антитела, но в прямой форме не ограничены ими. Например, гетеродимерные конструкции могут содержать один или более чем один scFv-фрагмент, один или более чем один Fab-фрагмент, например, scFv-фрагмент и Fab-фрагмент или два Fab-фрагмента. Типичные последовательности полипептидов гетеродимеров включают, без ограничения, любые из SEQ ID NO: 16-31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 48, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 68, 69, 70 и 71. Также включены варианты последовательностей, по меньшей мере на 70% идентичные (с сохранением биологической активности) любой из SEQ ID NO: 16-31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 48, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 68, 69, 70 и 71. Например, идентичные по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9% или более. Кроме того, любая из SEQ ID NO: 16-31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 48, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 68, 69, 70 и 71 может иметь одну или более чем одну консервативную замену и все равно входить в объем настоящего изобретения.

В биспецифичных гетеродимерных антителах по настоящему изобретению между первой и второй тяжелой цепью образуется одна или более чем одна дисульфидная связь. Образование дисульфидных связей может происходить либо во время экспрессии в одной и той же клетке, либо посредством реакции окисления при добавлении окислителя *in vitro*. Такое образование дисульфидных связей происходит в тех воплощениях, где проводят экспрессию полумеров, их очистку, восстановление добавлением восстановителя, смешивают их друг с другом и затем проводят их окисление с образованием гетеродимера.

Гетеродимеры по настоящему изобретению способны связываться с Fc-рецепторами, например, с одним или более из FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB1, FcγRIIB2, FcγRIIA, FcγRIIB, FcεRI, FcεRII, FcαRI, Fcα/μR и FcRn. В типичных воплощениях гетеродимеры сохраняют способность связываться с FcRn. При использовании здесь FcRn относится к рецептору, который структурно гомологичен семейству гетеродимерных рецепторов МНС класса I и содержит трансмембранную тяжелую цепь класса I (субъединица p51, альфа-цепь) и растворимую легкую цепь (субъединица p14, бета-цепь), соединенные друг с другом нековалентным взаимодействием. Сайт связывания FcRn на IgG расположен на линии соприкосновения CH2-CH3. Наиболее важными являются аминокислотные положения 253, 310 и 435.

В силу своих структурных характеристик, гетеродимеры по настоящему изобретению могут (но не обязательно) оказывать целевое воздействие на один или более чем один антиген одновременно. В типичных воплощениях антигены включают одно или более из HER2, PD-L1, TROP2, CD3 и/или CD20. Тем не менее, изобретение не ограничено указанными антигенами. Это связано с тем, что настоящее изобретение относится к модификациям константной области (CH3) антител/иммуноглобулиновых конструкций для улучшения их стабильности, периода полувыведения из сыворотки и терапевтической эффективности. Таким образом, технология, лежащая в основе настоящего изобретения, может быть применена к моноклональным антителам, связывающимся только с одним антигеном-мишенью. Это включает, например, известные терапевтические антитела. Такие антитела все еще могут быть усовершенствованы, благодаря повышенной стабильности, обеспечиваемой модифицированными константными областями. В таких случаях распознающие группировки на (или связанные с) первым полипептиде и вторым полипептиде будут оставаться неизменными, и "полуантитела" или "полумеры" могут различаться исключительно в области CH3.

Известные терапевтические моноклональные антитела, которые могут быть усовершенствованы модификациями, раскрытыми в настоящем изобретении, могут включать любые из следующих неограничивающих антител: 3F8, 8H9, абаговомаб, абиксимаб, абитузумаб, абрилумаб, актоксумаб, адалиму-маб, адекатумумаб, адуканумаб, афасевикумаб, афелимомаб, афутузумаб, алацизумаб пегол, ALD518, алемтузумаб, алирокумаб, алтумомаб пентетат, аматуксимаб, анатумомаб мафенатокс, анетумаб равтансин, анифролумаб, анрукинумаб, аполизумаб, арцитумомаб, аскринвакумаб, аселизумаб, атезолизумаб, атинумаб, атлизумаб, аторолимумаб, авелумаб, бапинейзумаб, базиликсимаб, бавитуксимаб, бектумомаб, бегеломаб, белимумаб, бенрализумаб, бертилимумаб, бесилесомаб, бевацизумаб, безлтоксумаб, бициромаб, бимагрумаб, бимекизумаб, биватузумаб мертансин, блеселумаб, блинатумомаб, блонтуветмаб, блосозумаб, бокоцизумаб, бразикумаб, брентуксимаб ведотин, бриакинумаб, бродалумаб, бролуцизумаб, бронтиктузумаб, бурсумаб, кабирализумаб, канакинумаб, кантузумаб мертансин, кантузумаб равтансин, каплацизумаб, капромаб пендетид, карлумаб, каротуксимаб, катумаксумаб, иммуноконъюгат cBR96-доксорибицин, цеделизумаб, цергутузумаб амуналейкин, цертолизумаб пегол, цетуксимаб, цитатузумаб

богатокс, циксутумумаб, клазакизумаб, кленоликсимаб, кливатузумаб тетраксетан, кодритузумаб, кол-туксимаб равтансин, конатумумаб, концизумаб, CR6261, кренезумаб, кротедумаб, дацетузумаб, даклизу-маб, далотузумаб, дапиролизумаб пегол, даратумумаб, дектрекумаб, демцизумаб, денинтузумаб мафодо-тин, деносумаб, депатуксизумаб мафодотин, дерлотуксимаб биотин, детумомаб, динутуксимаб, дирида-вумаб, домагрозумаб, дорлимомаб аритокс, дрозитумаб, дулиготумаб, дупилумаб, дурвалумаб, дусиги-тумаб, экромексимаб, экулизумаб, эдобакомаб, эдреколомаб, эфализумаб, эфунгумаб, элделумаб, элгем-тумаб, элотузумаб, элсилимомаб, эмактузумаб, эмибетузумаб, эмицизумаб, энаватузумаб, энфортумаб ведотин, энлимомаб пегол, эноблитузумаб, энокизумаб, энотикумаб, энситуксимаб, эпитумомаб цитуксе-тан, эпратузумаб, эренумаб, эрлизумаб, эртумаксамаб, этарацизумаб, этролизумаб, эвинакумаб, эволоку-маб, эксбивирумаб, фанолесомаб, фаралимомаб, фарлетузумаб, фасинумаб, FBTA05, фелвизумаб, феа-кинумаб, фибатузумаб, фиклатузумаб, фигитумумаб, фириумаб, фланвотумаб, флетикумаб, фонтолизу-маб, форалумаб, форапирумаб, фресолимумаб, фулранумаб, футуксимаб, галцанезумаб, галиксимаб, га-нитумаб, гантенерумаб, гавилимомаб, гемтузумаб озогамидин, гевокизумаб, гирентуксимаб, глембату-мумаб ведотин, голимумаб, гомиликсимаб, гуселькумаб, ибализумаб, ибритумомаб тиуксетан, икруку-маб, идаруцизумаб, иговомаб, IMAV362, ималумаб, имциромаб, имгатузумаб, инклакумаб, индатуксимаб равтансин, индусатумаб ведотин, инебилизумаб, инфликсимаб, инолимомаб, инотузумаб озогамидин, интетумумаб, ипилимумаб, иратумумаб, исатуксимаб, итолизумаб, иксекизумаб, келиксимаб, лабетузу-маб, лампализумаб, ланаделумаб, ландогрозумаб, лапритуксимаб эмтанзин, лебрикизумаб, лемалесомаб, лендализумаб, лентилумаб, лерделимумаб, лексатумумаб, либивирумаб, лифастузумаб ведотин, лигели-зумаб, лилотомаб сатетраксетан, линтузумаб, лирилумаб, лоделцизумаб, локиветмаб, лорвотузумаб мер-тансин, лукатумумаб, лулизумаб пегол, лумиликсимаб, лумретузумаб, MAVp1, мапатумумаб, маргетук-симаб, маслимомаб, матузумаб, маврилимумаб, меполизумаб, метелимумаб, милатузумаб, минретумо-маб, мирветуксимаб соравтансин, митумомаб, могамулизумаб, монализумаб, моролимумаб, мотавизу-маб, моксетумомаб пасудотокс, муромонаб-CD3, наколомаб тафенатокс, намилумаб, наптумомаб эста-фенатокс, наратуксимаб эмтанзин, нарнатумаб, натализумаб, навициксизумаб, навивумаб, небакумаб, нецитумумаб, немолизумаб, нерелимомаб, несвакумаб, нимотузумаб, ниволумаб, нофетумомаб мерпен-тан, обилтоксаксимаб, обинутузумаб, окаратузумаб, окрелизумаб, одулимомаб, офатумумаб, оларатумаб, олокизумаб, омализумаб, онартузумаб, онгуксизумаб, опицинумаб, опортузумаб монатокс, ореговомаб, ортикумаб, отеликсизумаб, отлартузумаб, окселумаб, озанезумаб, озорализумаб, пагибаксимаб, паливи-зумаб, памревлумаб, панитумумаб, панкомаб, панобакумаб, парсатузумаб, пасколизумаб, пасотуксизу-маб, патеклизумаб, патритумаб, пембролизумаб, пемтумомаб, перакизумаб, пертузумаб, пекселизумаб, пидилизумаб, пинатузумаб ведотин, пинтумомаб, плакулумаб, плюзализумаб, погализумаб, полатузумаб ведотин, понезумаб, презализумаб, приликсимаб, притоксаксимаб, притумумаб, PRO 140, квиллизумаб, ракотумомаб, радретумаб, рафивирумаб, ралпанцизумаб, рамуцирумаб, ранибизумаб, раксибакумаб, ре-фанезумаб, регавирумаб, реслизумаб, рилотумумаб, ринукумаб, рисанкизумаб, ритуксимаб, ривабазумаб пегол, робатумумаб, роледумаб, ромосозумаб, ронтализумаб, ровалпитузумаб тесирин, ровелизумаб, ру-плизумаб, сакитузумаб говитекан, самализумаб, сапелизумаб, сарилумаб, сатумомаб пендетид, секуки-нумаб, серибантумаб, сетоксаксимаб, севирумаб, SGN-CD19A, SGN-CD33A, сибротузумаб, сифалиму-маб, силтуксимаб, симтузумаб, сиплизумаб, сирукумаб, софитузумаб ведотин, соланезумаб, солитомаб, сонепцизумаб, сонтузумаб, стамулумаб, сулесомаб, сувизумаб, табалумаб, такатузумаб тетраксетан, та-доцизумаб, тализумаб, тамтуветмаб, танезумаб, таплитумомаб паптокс, тарекстумаб, тефибазумаб, тели-момаб аритокс, тенатумомаб, тенеликсимаб, теплизумаб, тепротумумаб, тесидолумаб, тетулумаб, тезепе-лумаб, TGN1412, тицилимумаб, тигатузумаб, тилдракизумаб, тимолумаб, тисотумаб ведотин, TNX-650, тоцилизумаб, торализумаб, тосатоксумаб, тозитумомаб, товетумаб, тралокинумаб, трастузумаб, трасту-зумаб эмтанзин, TRBS07, трегализумаб, тремелимумаб, тревогрумаб, тукотузумаб целмолейкин, тувиру-маб, ублитуксимаб, улоцуплумаб, урелумаб, уртоксазумаб, устекинумаб, утомилумаб, вадастуксимаб талирин, вандортузумаб ведотин, вантуктумаб, вануцизумаб, вапаликсимаб, варлилумаб, вателизумаб, ведолизумаб, велтузумаб, вепалимомаб, весенцумаб, визилизумаб, вобарилизумаб, волоциксимаб, ворсе-тузумаб мафодотин, вотумумаб, ксентузумаб, залутумумаб, занолимумаб, затуксимаб, зиралимумаб, зо-лимомаб аритокс и их комбинации.

Мишени могут включать любые из следующих неограничивающих мишеней: β -амилоид, 4-1BB, 5AC, 5T4, α -фетопротеин, ангиопоетин, AOC3, B7-H3, BAFF, c-MET, c-MYC, антиген C242, C5, CA-125, CCL11, CCR2, CCR4, CCR5, CD4, CD8, CD11, CD18, CD125, CD140a, CD127, CD15, CD152, CD140, CD19, CD2, CD20, CD22, CD23, CD25, CD27, CD274, CD276, CD28, CD3, CD30, CD33, CD37, CD38, CD4, CD40, CD41, CD44, CD47, CD5, CD51, CD52, CD56, CD6, CD74, CD80, CEA, CFD, CGRP, CLDN, CSF1R, CSF2, CTGF, CTLA-4, CXCR4, CXCR7, DKK1, DLL3, DLL4, DR5, EGFL7, EGFR, EPCAM, ERBB2, ERBB3, FAP, FGF23, FGFR1, GD2, GD3, GDF-8, GPNMB, GUCY2C, HER1, HER2, HGF, HIV-1, HSP90, ICAM-1, IFN- α , IFN- γ , IgE, CD221, IGF1, IGF2, IGHE, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6R, IL-9, IL-12, IL-15, IL-15R, IL-17, IL-13, IL-18, IL-1 β , IL-22, IL-23, IL-23A, интегрин, ITGA2, IGFBP2, антиген Льюиса Y, LFA-1, LOXL2, LTA, MCP-1, MIF, MS5A1, MUC1, MUC16, MSLN, миостатин, суперсемейст-во MMP, NCA-90, NFG, NOGO-A, Notch 1, NRP1, OX-40, OX-40L, суперсемейство P2X, PCSK9, PD-1,

PD-L1, PDCD1, PDGF-R, RANKL, RHD, RON, TRN4, сывороточный альбумин, SDC1, SLAMF7, SIRP α , SOST, SHP1, SHP2, STEAP1, TAG-72, TEM1, TIGIT, TFPI, TGF- β , TNF- α , суперсемейство TNF, суперсемейство TRAIL, Toll-подобные рецепторы, суперсемейства WNT, VEGF-A, VEGFR-1, VWF, цитомегаловирус (CMV), респираторно-синцитиальный вирус (RSV), вирус гепатита В, вирус гепатита С, гемагглютинин вируса гриппа А, вирус бешенства, вирус ВИЧ, вирус простого герпеса и их комбинации.

Гетеродимерные конструкции по настоящему изобретению могут иметь одну или более чем одну замену, делецию, присоединение и/или вставку, помимо пяти конкретных раскрытых здесь аминокислотных замен в домене СН3. Например, определенные аминокислоты белковой структуры могут быть заменены другими аминокислотами без существенного снижения способности связываться с другими полипептидами, такими как антигены, или клетками. Поскольку способность к связыванию и свойства белка определяют его биологическую активность, определенные аминокислоты в аминокислотной последовательности белка могут быть заменены без существенного снижения его биологической полезности или активности. Во многих случаях полипептидные варианты содержат одну или более чем одну консервативную замену.

Гетеродимерные конструкции по настоящему изобретению могут быть представлены в форме фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или растворитель. Возможно, композиция может содержать один или более чем один дополнительный фармацевтически активный ингредиент, такой как другое антитело или терапевтический агент. Фармацевтические композиции по изобретению могут также быть введены в рамках комбинированной терапии, например, с другим иммуностимулирующим агентом, противораковым агентом, противовирусным агентом, вакциной и так далее. В определенных воплощениях композиция содержит гетеродимер в концентрации по меньшей мере 1, 5, 10, 50, 100, 150 или 200 мг/мл. В некоторых воплощениях концентрация гетеродимера может составлять 1-300 мг/мл или 100-300 мг/мл.

Фармацевтическая композиция может содержать любое число эксципиентов. Эксципиенты, которые могут быть использованы, включают носители, поверхностно-активные агенты, загустители или эмульгаторы, твердые связывающие вещества, диспергирующие или суспендирующие вещества, солюбилизаторы, красители, корригенты, покрытия, разрыхлители, смазки, подсластители, консерванты, изотонические агенты и их комбинации. Выбор и применение подходящих эксципиентов описаны в Genparo, ed., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 2003), содержание которой включено сюда посредством ссылки.

Предпочтительно фармацевтическая композиция является подходящей для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, инъекцией или инфузией). В зависимости от пути введения, активное соединение может быть покрыто веществом, защищающим его от действия кислот и других естественных условий, которые могут привести к его инактивации. При использовании здесь фраза "парентеральное введение" обозначает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно инъекционные, и включает без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриаартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, интракардиальную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, интраартикулярную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интратеральную инъекцию и инфузию. Альтернативно антитело по настоящему изобретению, описанное здесь, может быть введено непарентеральным путем, таким как местный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

Фармацевтическая композиция по изобретению может быть представлена в форме фармацевтически приемлемых солей. "Фармацевтически приемлемая соль" относится к соли, которая сохраняет желаемую биологическую активность исходного соединения и не оказывает никаких нежелательных токсикологических эффектов. Примеры таких солей включают соли присоединения кислот и соли присоединения оснований. Соли присоединения кислот включают соли, имеющие происхождение от нетоксичных неорганических кислот, таких как соляная, азотная, фосфорная, серная, бромоводородная, йодоводородная, фосфористая и тому подобные, а также от нетоксичных органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенил-замещенные алкановые кислоты, гидроксисаллановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфоновые кислоты и тому подобные. Соли присоединения оснований включают соли, имеющие происхождение от щелочных и щелочноземельных металлов, таких как натрий, калий, магний, кальций и тому подобные, а также от нетоксичных органических аминов, таких как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и тому подобные.

Фармацевтически приемлемая композиция может быть представлена в жидкой форме или в твердой форме. Твердая композиция обычно, но не обязательно, лиофилизирована, и перед введением из нее получают раствор для однократного или многократного введения. Воздействия экстремальных температур или pH на композиции необходимо избегать, чтобы не допустить термической денатурации. Таким образом, композиция антител по настоящему изобретению должна быть изготовлена так, чтобы иметь биоло-

гически приемлемый pH. Часто необходим раствор, забуференный для поддержания соответствующего диапазона pH, особенно в случае жидких композиций, хранящихся на протяжении длительных периодов времени от изготовления до введения. Обычно как жидкие, так и твердые композиции необходимо хранить при пониженных температурах (обычно 2-8°C) для сохранения стабильности на протяжении более длительных периодов времени. Изготовленные композиции антител, особенно жидкие композиции, могут содержать бактериостатический агент для предотвращения или минимизации протеолиза во время хранения, включая, без ограничения, эффективные концентрации (обычно менее 1% мас./об.) бензилового спирта, фенола, м-крезола, хлорбутанола, метилпарабена и/или пропилпарабена. Бактериостатический агент может быть противопоказан некоторым пациентам. Таким образом, лиофилизированная композиция может быть восстановлена в растворе, содержащем или не содержащем такой компонент. В забуференную жидкую или твердую композицию антител могут быть добавлены дополнительные компоненты, включая, без ограничения, сахара в качестве криопротекторов (включая, без ограничения, полигидроксуглеводороды, такие как сорбит, маннит, глицерин и дульцит, и/или дисахариды, такие как сахароза, лактоза, мальтоза или трегалоза) и, в некоторых случаях, соответствующая соль (включая, без ограничения, NaCl, KCl или LiCl). Важным свойством таких композиций антител, особенно жидких композиций, предназначенных для длительного хранения, будет диапазон общей осмолярности, полезный как с точки зрения повышения стабильности во время длительного хранения при температуре 2-8°C или выше, так и с точки зрения возможности их парентерального введения. Например, но не обязательно, эффективный диапазон общей осмолярности (общего числа молекул в растворе) может составлять от приблизительно 200 мОсм/л до приблизительно 800 мОсм/л. Очевидно, что количество криопротектора, такого как сахароза или сорбит, будет зависеть от количества соли в композиции, чтобы общая осмолярность раствора не выходила за пределы соответствующего диапазона. Поэтому свободная от соли композиция может, но не обязательно, содержать от приблизительно 5% до приблизительно 25% сахарозы.

Альтернативно, свободная от соли композиция на основе сорбита может, но не обязательно, содержать сорбит в диапазоне от приблизительно 3% до приблизительно 12%. Разумеется, в свободных от соли композициях диапазоны соответствующего криопротектора должны быть больше, чтобы поддерживать эффективные уровни осмолярности. Эти композиции могут также содержать двухвалентный катион (включая, без ограничения, $MgCl_2$, $CaCl_2$ и $MnCl_2$); неионное поверхностно-активное вещество (включая, без ограничения, полисорбат-80 (Tween 80®), полисорбат-60 (Tween 60®), полисорбат-40 (Tween 40®) и полисорбат-20 (Tween 20®), алкиловые эфиры полиоксиэтилена, включая, без ограничения, Brij 58®, Brij 35®, а также другие, такие как Triton X-100®, Triton X-114®, NP40®, Span 85 и серию неионных поверхностно-активных веществ Pluronic (например, Pluronic 121)). В композициях по настоящему изобретению, содержащих антитела, может быть использована любая комбинация таких компонентов, включая, вероятно, бактериостатический агент. Гетеродимер по настоящему изобретению может также представлять собой "химическое производное", под которым понимают антитело, содержащее дополнительные химические группировки, обычно не являющиеся частью молекулы иммуноглобулина (например, пегилирование). Такие группировки могут улучшать растворимость, период полувыведения, абсорбцию исходной молекулы и так далее. Альтернативно, эти группировки могут ослаблять нежелательные побочные эффекты исходной молекулы или уменьшать токсичность исходной молекулы. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть представлена в форме стерильных водных растворов или дисперсий. Она может также быть изготовлена в форме микроэмульсии, липосом или других заданных структур, подходящих для высокой концентрации лекарственного средства.

Гетеродимерные конструкции по настоящему изобретению способны связываться с несколькими молекулами-мишенями одновременно и поэтому более эффективны в лечении сложных заболеваний. Гетеродимерные конструкции по настоящему изобретению могут быть введены субъекту, нуждающемуся в этом, для лечения заболевания или расстройства, например, вирусной или бактериальной инфекции, метаболического или аутоиммунного расстройства или рака или другого клеточного пролиферативного расстройства. В некоторых воплощениях аутоиммунные заболевания включают по меньшей мере одно из артрита, ревматоидного артрита, псориаза, рассеянного склероза (РС), язвенного колита, болезни Крона, системной красной волчанки (СКВ), гломерулонефрита, заболеваний наподобие дилатационной кардиомиопатии, синдрома Шегрена, аллергического контактного дерматита, полимиозита, склеродермии, узелкового периартериита, ревматизма, витилиго, инсулинозависимого сахарного диабета, синдрома Бехчета, хронического тиреоидита и их комбинаций. В некоторых воплощениях нейродегенеративные заболевания включают по меньшей мере одно из болезни Паркинсона, болезни Гентингтона, болезни Мачадо-Джозефа, бокового амиотрофического склероза (БАС), болезни Крейтцфельда-Якоба и их комбинаций. В некоторых воплощениях опухолевые заболевания и клеточные пролиферативные расстройства включают по меньшей мере одно из лейкоза, лимфомы, миеломы, опухолей головного мозга, плоскоклеточного рака головы и шеи, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака носоглотки, рака пищевода, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака печени, колоректального рака, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака эндометрия, саркомы матки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, почечноклеточного рака, меланомы и их комбинаций.

Кроме того, настоящее изобретение направлено на одну или более чем одну нуклеиновую кислоту, кодирующую один или более чем один полипептид гетеродимерных конструкций по настоящему изобретению. Типичные нуклеиновые кислоты кодируют любую из SEQ ID NO: 16-31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 48, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 68, 69, 70 и 71. В некоторых воплощениях нуклеиновые кислоты могут содержать любую из SEQ ID NO: 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 47, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62 и 64-67. Также включены варианты последовательностей, по меньшей мере на 70% идентичные любой из SEQ ID NO: 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 47, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62 и 64-67. Например, идентичные по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9% или более. Кодоны вариантных последовательностей нуклеиновых кислот могут быть оптимизированы. При использовании здесь оптимизация кодонов относится к *in vitro*-мутагенезу нуклеиновой кислоты для повышения или максимизации экспрессии гена (например, трансгенного относительно немодифицированной нуклеиновой кислоты без изменения (или с минимальным изменением) аминокислотной последовательности синтезируемого белка), то есть к синонимичным мутациям. Оптимизация кодонов позволяет повысить уровни экспрессии белка до 1000 раз и особенно эффективна применительно к экспрессии растворимого белка. В большинстве случаев заменяют те кодоны, которые не используются трансляционной системой клетки-хозяина.

Объем данного изобретения включает последовательности нуклеиновых кислот, способные гибридизоваться с нуклеиновой кислотой или фрагментом (или комплементарной последовательностью) по настоящему изобретению в условиях умеренной или высокой жесткости. Методики гибридизации хорошо известны в области молекулярной биологии. Например, подходящие условия анализа включают предварительную промывку в растворе 5x SSC, 0,5% SDS, 1,0 mM EDTA (pH 8,0); гибридизацию в течение ночи при 50-60°C, 5x SSC; с последующей двукратной промывкой на протяжении 20 мин с использованием 2x, 0,5x и 0,2x раствора SSC, содержащего 0,1% SDS, соответственно. Альтернативно подходящие условия высокой жесткости для гибридизации включают условия, описанные выше, за исключением повышения температуры гибридизации, например, до 60-65°C или 65-70°C.

Нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут содержаться в векторе или системе векторов. Вектор может представлять собой, например, но не обязательно, плазмиду. Другие явно не ограничивающие рекомбинантные векторы включают "челночные" векторы и векторы экспрессии. Обычно плазмидная конструкция содержит репликатор (например, репликатор ColE1) и селективные маркеры (например, резистентности к ампициллину или тетрациклину). Векторы экспрессии включают векторы, содержащие контрольную последовательность или регуляторный элемент, необходимый для экспрессии, например, гетеродимерной конструкции по настоящему изобретению. Другие явно не ограничивающие рекомбинантные векторы известны в данной области и могут включать, например, фаговые векторы, такие как вектор на основе фага λ , другие вирусные векторы, такие как нереплицирующийся аденовирусный вектор, лентивирусный вектор, серии плазмидных векторов pSV и pCMV, векторы на основе вируса коровьей оспы и ретровирусные векторы, бакуловирусные векторы, космиды и искусственные хромосомы. Вектор экспрессии может представлять собой вектор экспрессии для клеток млекопитающих. Например, векторы могут быть использованы для трансфекции клеток млекопитающих, и, в случае стабильной трансфекции, ДНК может быть интегрирована в геном гомологичной рекомбинацией, или, альтернативно, может быть проведена транзиторная трансфекция клеток. Большинство сконструированных векторов содержат репликаторы, множественные сайты клонирования и селективные маркеры, поэтому векторы (включая системы векторов, например, из нескольких плазмид), содержащие такую систему, рассматриваются как входящие в объем данного изобретения. Промоторы, часто используемые в векторах экспрессии для клеток млекопитающих, включают промоторы CMV и SV40. Также известны невирусные промоторы, такие как EF-1. Типичные векторы включают плазмидные векторы pX0GC, полученные модификацией векторов pCDNA.

Настоящее изобретение также включает клетки-хозяева, содержащие вектор или систему векторов по любому аспекту настоящего изобретения. Специалисту в данной области будет ясно, что использование разных типов клеток может приводить к различиям в полученных гетеродимерных конструкциях и, возможно, может влиять на их терапевтическую эффективность. Например, клетки-хозяева могут (но не обязательно) включать любые из следующих типов клеток: клетки эмбриональной почки человека (HEK293) или HEK293T, HEK293E, HEK293F, полученные модификацией клеток HEK293, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или CHO-S, CHO-dhfr⁻, CHO/DG44, ExpiCHO, полученные модификацией клеток CHO, и родственные клеточные линии. Другие клеточные линии, известные в данной области, включают клетки мышинной миеломы NS0, человеческие клетки PER.C6, клетки дрожжей, например, *S. cerevisiae*, *S. pombe* и *P. pastoris*, и клетки бактерий, например, *E. coli*. Также существуют бесклеточные системы экспрессии, например, на основе лизатов клеток *E. coli*, содержащих компоненты клеток, необходимые для транскрипции/трансляции. В данной области также известны бесклеточные системы, полученные из эукариотических клеток и клеток млекопитающих, например, бесклеточная система экспрессии, полученная из зародышевых клеток пшеницы, и системы, описанные в Brodel et al. (2015), *Methods Mol Bio.* 1261: 129-40, полностью включенной сюда посредством ссылки. В некоторых системах для по-

лучения рекомбинантных антител происходит экспрессия рекомбинантных антител на поверхности клеток-хозяев перед их сбором, а в других - простое высвобождение получаемых антител в среду. Подразумевается, что такие варианты входят в объем настоящего изобретения.

При использовании здесь термин "антитело" (Ab) использован в наиболее широком смысле и, конкретно, может включать любой иммуноглобулин, естественный или полученный частично или полностью синтетическим путем, включая, без ограничения, моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела и полиреактивные антитела) и фрагменты антител. Таким образом, подразумевается, что при использовании в любом контексте в данном изобретении термин "антитело" включает, без ограничения, любой специфичный связывающий элемент, класс и/или изотип иммуноглобулина (например, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE) и их биологически значимые фрагменты или специфичные связывающие элементы, включая, без ограничения, Fab, F(ab')₂, scFv (одноцепочечный или родственный ему фрагмент) и (scFv)₂.

При использовании здесь термин "фрагменты антител" может включать фрагменты антител, полученные с применением методик, хорошо известных и доступных специалистам в данной области, как описано здесь. Таким образом, в дополнение к определению "антитела", представленному выше, термин "антитело" может дополнительно включать любой полипептид или белок, содержащий часть интактного антитела, такую как антигенсвязывающая или вариабельная область интактного антитела. Они могут иметь происхождение из естественных источников или могут быть получены частично или полностью синтетическим путем. Примеры фрагментов антител включают, без ограничения, Fab-, Fab'-, F(ab')₂- и Fv-фрагменты, диатела и линейные антитела.

При использовании здесь термин "антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" или "ADCC" может относиться к клеточно-опосредованной реакции, при которой цитотоксические клетки (например, неспецифические), экспрессирующие FcR (например, натуральные клетки-киллеры (NK-клетки), нейтрофилы и макрофаги) распознают связанное антитело на клетке-мишени и затем приводят к лизису клеток-мишеней. Основные клетки, опосредующие ADCC, NK-клетки, экспрессируют FcγRIII, в то время как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII.

При использовании здесь термин "биспецифичное антитело" относится к антителу, способному связываться с двумя разными эпитопами одного антигена или двух разных антигенов. Эпитопы могут быть образованы как смежными аминокислотами (линейные эпитопы), так и несмежными аминокислотами, расположенными друг рядом с другом при формировании третичной структуры белка (конформационные эпитопы). Эпитопы, образованные смежными аминокислотами, обычно сохраняются при воздействии денатурирующими растворителями, в то время как эпитопы, образованные третичной структурой, обычно утрачиваются при воздействии денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно содержит по меньшей мере 3, а чаще по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот, расположенных в уникальной пространственной конформации. Биспецифичное антитело по настоящему изобретению может быть бивалентным, тривалентным или тетравалентным. При использовании здесь "валентный", "валентность", "валентности" или их другие грамматические варианты обозначают число антигенсвязывающих сайтов в молекуле антитела. Эти сайты распознавания могут распознавать один и тот же эпитоп или разные эпитопы.

При использовании здесь термин "носители" может включать фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы, нетоксичные для клетки или млекопитающего, на которого они воздействуют в используемых дозах и концентрациях.

Часто фармацевтически приемлемый носитель представляет собой водный pH-буферный раствор. Примеры физиологически приемлемых носителей включают, без ограничения: буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая, без ограничения, аскорбиновую кислоту; пептиды малой молекулярной массы (менее 10 остатков); белки, такие как, без ограничения, сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как, без ограничения, поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как, без ограничения, глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая, без ограничения, глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как, без ограничения, EDTA; сахарные спирты, такие как, без ограничения, маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как, без ограничения, натрий; и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как, без ограничения, TWEEN, полиэтиленгликоль (PEG) и PLURONIC. В композициях по настоящему изобретению может быть использована любая комбинация таких компонентов, включая, вероятно, бактериостатический агент.

При использовании здесь термины "консервативные модификации последовательности" или "консервативные замены" могут относиться к аминокислотным модификациям эпитопа-мишени или антител и их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению, не оказывающим существенного влияния на или не изменяющим характеристики связывания гетеродимерных иммуноглобулиновых конструкций по настоящему изобретению. Такие консервативные модификации включают аминокислотные замены, присоединения и делеции. Антитело по изобретению может быть модифицировано стандартными методами, известными в данной области, такими как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный

мутагенез. Консервативные аминокислотные замены представляют собой аминокислотные замены, при которых аминокислотный остаток заменяют аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Такие замены обычно основаны на относительном сходстве заместителей в боковых цепях аминокислот, например, на их гидрофобности, гидрофильности, заряде, размере и так далее. В данной области определены семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин), и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

При использовании здесь термин "внеклеточный домен" или "внеклеточный домен мембранного рецептора" относится к последовательности (последовательностям) молекулярного распознавания, обычно включающей внеклеточные области, расположенные за пределами клетки, распознающие и связывающие соответствующий антиген или лиганд, связанные с рецептором в его трансмембранном домене и взаимодействующие с внутриклеточным доменом, обладающим внутриклеточной киназной активностью, или с сигнальными путями. Лиганд может относиться к белку, малому пептиду или соединению, которое может быть распознано и связано внеклеточным доменом мембранного рецептора. Иммуногенные, митогенные или другие стимулы могут стимулировать образование растворимых белков малой молекулярной массы различными клетками. Они могут модулировать врожденный и адаптивный иммунитет, гемопоэз, рост клеток, APSC плюрипотентные клетки и корректировать репарацию тканей после повреждения. Цитокины могут быть разделены на интерлейкины, интерфероны, супер семейство фактора некроза опухоли, колониестимулирующие факторы, хемокины, гормоны роста. Метка на экспрессируемом белке относится к аминокислотной последовательности, присоединенной к N-концу или C-концу целевого белка, которая может представлять собой малый пептид или длинную аминокислоту. Присоединение метки может способствовать правильному сворачиванию белка и может быть использовано для разделения и очистки белка. Она может быть полезна для уменьшения деградации белков в клетке. Часто используемые метки включают, без ограничения, HA, SUMO, His, GST, GFP и Flag.

При использовании здесь термин "Fab-фрагмент" может относиться к распознающей группировке, представляющей собой фрагмент антигенсвязывающего фрагмента (Fab) любой из двух половин молекулы антитела, содержащей связанные между собой легкую цепь и домены VH и CH1 тяжелой цепи.

При использовании здесь термин "Fc" относится к области "критализуемого фрагмента", которая содержит константные домены CH2 и CH3 и представляет собой область иммуноглобулина, взаимодействующую с эффекторными молекулами или клетками, например, с Fc-рецепторами.

При использовании здесь термин "Fc-рецептор" или "FcR" использован для описания рецептора, связывающегося с Fc-областью (например, Fc-областью антитела или фрагмента антитела). Данный термин включает неонатальный рецептор, FcRn, обеспечивающий перенос материнских IgG плоду. Другие Fc-рецепторы включают любой из FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB1, FcγRIIB2, FcγRIIA, FcγRIIB, FcεRI, FcεRII, FcαRI и FcαμR.

При использовании здесь термин "гомология" может относиться к наличию у двух композиций общей структуры. Применительно к белкам термин "гомология" может относиться к степени (например, в процентном выражении) совпадения двух или более аминокислотных и/или пептидных последовательностей. Применительно к нуклеиновым кислотам термин "гомология" может относиться к степени (например, в процентном выражении) совпадения последовательностей двух или более нуклеиновых кислот. При использовании здесь процент (%) гомологии двух последовательностей эквивалентен проценту идентичности этих двух последовательностей. Процент идентичности двух последовательностей является функцией числа идентичных положений в этих последовательностях (то есть % гомологии равен отношению числа идентичных положений к общему числу положений, умноженному на 100), с учетом числа разрывов и длины каждого разрыва, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности двух последовательностей можно провести с применением математического алгоритма. Такая гомология хорошо представлена в инструментах и/или алгоритмах локального выравнивания и может включать парное выравнивание, методы множественного выравнивания последовательностей, методы структурного выравнивания и/или методы филогенетического анализа. Когда последовательности различаются консервативными заменами, процент идентичности последовательностей можно, но не обязательно, корректировать в сторону повышения для учета консервативной природы замен. Способы такой корректировки хорошо известны специалистам в данной области. Обычно, но не обязательно, они включают учет консервативной замены как частичного, а не полного несовпадения, что повышает процент идентичности последовательностей. Так, например, если идентичной аминокислоте присваивается значение 1, а неконсервативной замене присваивается значение "ноль", то консервативной замене присваивается значение между нулем и 1.

При использовании здесь термин "иммуноглобулин" относится к симметричной структуре с четырьмя полипептидными цепями, включая две тяжелые цепи с более протяженной последовательностью, содержащей 450-550 аминокислотных остатков, и большей относительной молекулярной массой 55000-70000 Да и две легкие цепи (L-цепи) с менее протяженной последовательностью, содержащей приблизительно 210 аминокислотных остатков, и меньшей относительной молекулярной массой приблизительно 24000 Да. 110 аминокислот, расположенные ближе к N-концу, у разных тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов существенно различаются и известны как переменная область (переменная область, V-область), а остальная аминокислотная последовательность, расположенная ближе к C-концу, относительно постоянна, и ее называют константной областью (константная область, C-область). Переменная область тяжелой цепи составляет приблизительно одну четверть всей последовательности тяжелой цепи, а константная область составляет приблизительно три четверти. IgG имеют три константные области тяжелой цепи, называемые CH1, CH2 и CH3. Константная область является как скелетом молекулы иммуноглобулина, так и одним из сайтов активации иммунного ответа. В настоящем изобретении константная область включает область, в которой первые полипептиды взаимодействуют со вторыми полипептидами, содержащую аминокислоты, расположенные в домене CH3. Эти аминокислоты включают, без ограничения, глутамин347, тирозин349, треонин350, лейцин351, серин354, аргинин355, аспарагиновую кислоту356, глутаминовую кислоту357, лизин360, серин364, треонин366, лейцин368, лизин370, аспарагин390, лизин392, треонин394, пролин395, валин397, аспарагиновую кислоту399, серин400, фенилаланин405, тирозин407, лизин409 и лизин439.

При использовании здесь термины "очищенное" или "выделенное" антитело, пептид, полипептид или белок могут относиться к пептиду, полипептиду или белку, который был отделен от других белков, липидов и нуклеиновых кислот, с которыми он связан естественным образом. Полипептид/белок может составлять по меньшей мере 10% (то есть любой процент от 10 до 100%, например 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95 и 99%) сухой массы очищенного препарата. Степень чистоты может быть измерена любым подходящим стандартным методом, например, хроматографией на колонках, электрофорезом в полиакриламидном геле или HPLC-анализом.

При использовании здесь термин "scFv" может относиться к одноцепочечному переменному фрагменту. scFv представляет собой слитый белок переменных областей тяжелой (VH) и легкой цепей (VL) иммуноглобулина, соединенных линкерным пептидом. Длина линкерного пептида может составлять от приблизительно 5 до 40 аминокислот или от приблизительно 10 до 30 аминокислот или приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 аминокислот. Типичным линкером является

GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 72).

Термины "специфичное связывание", "селективное связывание", "селективно связывается" и "специфично связывается" могут относиться к антителу, связывающемуся с эпитопом предопределенного антигена, но не с другими антигенами. Обычно антитело связывается с равновесной константой диссоциации (K_D) приблизительно менее 10^{-6} М, например, приблизительно менее 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или еще меньше, при ее определении, например, равновесным диализом или технологией поверхностного плазмонного резонанса (surface plasmon resonance, SPR) в приборе для поверхностного плазмонного резонанса BIACORE® 2000 с использованием предопределенного антигена, например, эпитопа Her2, PD-L1, TROP-2, CD3 и/или CD20, в качестве анализата и антитела в качестве лиганда, или в анализе связывания антитела с антиген-положительными клетками методом Скэтчарда, и (ii) связывается с предопределенным антигеном с аффинностью, по меньшей мере в два раза превышающей аффинность его связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеин), отличным от предопределенного антигена или близкородственного антигена.

При использовании здесь термины "субъект" или "пациент" могут относиться к биологической системе, подлежащей лечению. Биологическая система может включать, например, отдельную клетку, группу клеток (например, клеточная культура), орган, ткань или многоклеточный организм. Субъект по настоящему изобретению может включать птиц, рептилий, млекопитающих и тому подобное. Предпочтительно, млекопитающее включает грызунов и приматов, включая человека.

При использовании здесь термины "осуществление лечения" или "лечение" заболевания могут относиться к исполнению протокола, который может включать введение одного или более чем одного лекарственного средства пациенту (являющемуся человеком или не являющемуся человеком) в попытке положительным образом изменить признаки или симптомы заболевания. Положительное изменение возможно как до появления признаков или симптомов заболевания, так и после их появления. Таким образом, "осуществление лечения" или "лечение" включает "осуществление предотвращения" или "предотвращение" заболевания. Кроме того, "осуществление лечения" или "лечение" не требует полного облегчения признаков или симптомов, не требует излечения и прямо включает протоколы, которые могут оказывать на пациента лишь частичный эффект.

При использовании здесь термин "вариант Fc-области" относится к аминокислотной последовательности, отличающейся от нативной последовательности Fc-области (или ее частей) по меньшей мере одной аминокислотной модификацией (например, заменой, вставкой или делецией), включая гетеродимерные варианты, в которых последовательности тяжелых цепей-субъединиц могут отличаться друг от друга.

Типичные аминокислотные модификации по настоящему изобретению включают T366L, D399R, L351E, Y407L и/или K409V в области CH3.

Если контекстом ясно не продиктовано иное, при использовании здесь и в приложенной формуле изобретения формы единственного числа включают множественное число.

Термин "приблизительно" относится к диапазону значений, которые специалист в данной области не будет рассматривать как существенно отличающиеся от исходных значений. Например, термин "приблизительно" может относиться к значению, отличающемуся от заявленного значения не более чем на 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05 или 0,01%, а также значения, перекрывающиеся с этими заявленными значениями, что будет определяться контекстом.

При использовании здесь термин "связывающий (связывающийся) элемент" относится к агенту, например, белку или белковому комплексу (такому как антитело или его фрагмент), малой молекуле и тому подобному, специфично связывающемуся с мишенью, такой как Fc-рецептор. Элемент, специфично связывающийся с Fc-рецептором, относится к агенту, который специфично связывается с Fc-рецептором. Термины "специфичное связывание", "специфично связывается" и тому подобные относятся к предпочтительному связыванию с одной молекулой в сравнении с другими молекулами или группировками в растворе или реакционной смеси. В некоторых воплощениях аффинность связывающего элемента в отношении мишени, с которой он специфично связывается, характеризуется K_d (константа диссоциации) 10^{-6} М или менее, такой как 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М или менее.

При использовании здесь термин "распознающие группировки" относится к областям агента, способным специфично взаимодействовать с молекулами-мишенями (например, антигенами, лигандами, рецепторами, субстратами) с высокой степенью селективности. Типичные распознающие группировки включают вариабельную область антитела, структурный вариант вариабельной области антитела, связывающий домен рецептора, связывающий домен лиганда или связывающий домен фермента. В настоящем изобретении распознающую группировку определяют как когнатную распознающую группировку цепи, с которой она связана. Природа этой связи может быть ковалентной или нековалентной, в зависимости от контекста и окружения. Например, биспецифичное гетеродимерное антитело по настоящему изобретению имеет распознающие группировки, ковалентно связанные с их соответствующими цепями, в то время как связь полумера такого биспецифичного антитела, в условиях, являющихся в достаточной мере восстанавливающими, с соответствующей цепью может быть по меньшей мере частично нековалентной.

При использовании здесь термин "физиологическое условие" или "физиологические условия" относится к условию или условиям окружающей среды, которые могут встречаться в природе в организме или клеточной системе, или условию, при котором некоторые характеристики (например, температура) могут выходить за пределы диапазона значений, наблюдаемых в живом организме, но, тем не менее, позволяют биспецифичному гетеродимерному антителу по изобретению в некоторой степени выполнять свои функции. Неограничивающим примером физиологических условий являются температура, ионная сила, pH и концентрация ионов (например, Ca^{2+} или Mg^{2+}), обычно наблюдаемые внутри или вблизи клетки, такой как клетка млекопитающего. Температура в диапазоне приблизительно 2-40°C (например, 20-40°C), атмосферное давление приблизительно 1, pH приблизительно 6-8, концентрация глюкозы приблизительно 1-20 mM, концентрация кислорода, приблизительно соответствующая его концентрации в атмосфере, и земное притяжение также являются примерами физиологических условий. При использовании здесь для описания условий этот термин можно также сочетать с другими конкретными ограничениями. Следует понимать, что в таких случаях этот термин необходимо правильно интерпретировать с учетом контекста описываемых таким образом условий. Например, описание водного раствора как соответствующего физиологическим условиям и в достаточной степени восстанавливающего, например, содержащего 1 mM дитиотреитола, такого как забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS) при 2-4°C с 1 mM дитиотреитола, не подразумевает, что весь этот раствор позволяет антителу выполнять свои функции даже в присутствии восстановителя, но подразумевает, что, помимо дитиотреитола, остальные элементы или характеристики раствора это позволяют.

При использовании здесь термин "по существу свободный" относится к уровням определенного компонента, такого как полипептид, не поддающимся выявлению с применением рутинных методов и протоколов выявления, известных специалисту в данной области, таких как вестерн-блот, ELISA, RIA, HPLC (включая хиральную HPLC, хиральную HPLC/MS, LC/MS/MS и так далее), тонкослойная хроматография, масс-спектрометрия, поляриметрические измерения, газовая хроматография - масс-спектрометрия или другие.

Публикации, раскрытые здесь, приведены исключительно в силу их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Ничто из приведенного здесь не следует толковать как признание того, что настоящее изобретение не предшествует таким публикациям. Кроме того, приведенные даты публикаций могут отличаться от фактических дат публикации, которые могут нуждаться в независимом подтверждении.

Все публикации и патенты, на которые в данном тексте сделана ссылка, а также все документы или справочные материалы, патентные или непатентные литературные источники, на которые сделаны ссылки в каждой из этих заявок и патентов (в том числе при рассмотрении заявок на каждый выданный па-

тент; "документы, на которые сделана ссылка в материалах заявки"), и все международные и локальные заявки или патенты, соответствующие и/или притязающие на приоритет любой из этих заявок или патентов, и все документы, на которые ссылаются документы, на которые сделана ссылка в материалах заявки, в прямой форме и полностью включены сюда посредством ссылки. В более общей форме, в данном тексте, в перечне ссылок перед формулой изобретения или в самом тексте, есть ссылки на документы и источники, и все эти документы или источники ("источники, на которые здесь сделана ссылка"), а также все документы и источники, на которые ссылаются источники, на которые здесь сделана ссылка (включая любые производственные спецификации, инструкции и так далее), в прямой форме включены сюда посредством ссылки.

Для дальнейшего описания настоящего изобретения приведены следующие неограничивающие примеры.

VII. Примеры

Пример 1. Скрининг мутационных сайтов для получения гетеродимеров.

В область домена CH3 тяжелой цепи IgG1 были введены мутации, стимулирующие образование гетеродимеров. Анализ аминокислот, имеющих наибольшее значение при взаимодействии двух гомологичных доменов CH3 IgG1 (обозначаемых далее CH3-A и CH3-B), проводили, как описано в J. Biol. Chem. 2010, 285:19637-19646, полностью включенной сюда посредством ссылки. В Банке данных белковых структур (Protein Data Bank, PDB) были найдены 27 последовательностей антител и в них были выбраны аминокислоты, исходя из критериев, основанных на контактном методе, в котором соприкасающиеся остатки определяют как остатки, у которых тяжелые атомы боковых цепей расположены на расстоянии менее установленного лимита 4,5 Å (0,45 нм) от тяжелых атомов любых остатков второй цепи.

Был проведен дополнительный скрининг аминокислот, расположенных на линии соприкосновения доменов CH3, заменой их на аланин с определением изменений энергии диссоциации и разворачивания при денатурации гидрохлоридом гуанидина для отбора аминокислот, оказывавших наибольшее влияние на эту энергию в сравнении с диким типом. Результаты продемонстрировали, что мутации в положениях Thr366, Leu368, Phe405, Tyr407, Lys409 приводили к изменению свободной энергии более чем на 2 ккал/моль (8,368 кДж/моль); см. также Biochemistry. 1998 Jun 30;37(26):9266-73, полностью включенную сюда посредством ссылки. Расстояние между аминокислотами, расположенными на линии соприкосновения, было также проанализировано программным обеспечением PyMOL и DS, результаты представлены в табл. 1. Выделение курсивом и подчеркивание указывает на наличие водородных связей между остатками. Исходя из расстояния между аминокислотами на линии соприкосновения и результатов сканирования аланиновыми мутациями, для стимуляции образования гетеродимеров были выбраны следующие мутационные сайты: Thr366, Asp399 в первом полипептиде/доме CH3 и Leu351, Tyr407 и Lys409 во втором полипептиде/доме CH3.

Таблица 1

Расстояние между тяжелыми атомами на линии соприкосновения доменов CH3

Цепь А	Цепь В (единица измерения: Å (10 ⁻¹⁰ м))			
GLN 347	LYS 360 3,9			
TYR 349	SER 354 3,7	ASP 356 3,9	GLU 357 3,6	LYS 360 4,1
THR 350	SER 354 3,8	ARG355 5,9		
<u>LEU 351</u>	LEU 351 4,1	SER 354 3,6	<u>THR 366 3,8</u>	
SER 354	TYR 349 4,1	THR 350 3,8	LEU 351 3,8	
ARG 355	THR 350 5,9			
<u>ASP 356</u>	TYR 349 3,9	<u>LYS 439 2,8</u>		
GLU 357	TYR 349 3,7	LYS 370 4,2		
LYS 360	GLN 347 3,8	TYR 349 4,1		
SER 364	LEU 368 3,9	LYS 370 3,9		
<u>THR 366</u>	LEU 351 3,7	<u>TYR 407 2,9</u>		
LEU 368	SER 364 3,8	LYS 409 4,2		
LYS 370	GLU 357 3,9	SER 364 4,1		
<u>ASN 390</u>	<u>SER 400 3,5</u>			
LYS 392	ASP 399 3,6	SER 400 4,0	PHE 405 3,7	
THR 394	THR 394 3,7	VAL 397 4,1	PHE 405 4,0	TYR 407 4,3
PRO 395	VAL 397 3,9			

VAL 397	THR 394 4,0	PRO 395 4,0		
<u>ASP 399</u>	LYS 392 3,7	<u>LYS 409 2,8</u>		
<u>SER 400</u>	<u>ASN 390 3,2</u>	LYS 392 4,1		
PHE 405	LYS 392 3,5	THR 394 4,6	LYS 409 3,6	
<u>TYR 407</u>	<u>THR 366 2,7</u>	THR 394 4,3	TYR 407 3,9	LYS 409 3,4
<u>LYS 409</u>	LEU 368 4,0	<u>ASP 399 2,8</u>	PHE 405 4,0	TYR 407 3,6
<u>LYS 439</u>	<u>ASP 356 2,9</u>			

Пример 2. Конструирование библиотеки для дисплея Fc-гетеродимера на эукариотических клетках
2.1. Конструирование дисплейного вектора для Fc-гетеродимера.

Дисплейный вектор для Fc-гетеродимера pDis3 был получен модификацией дисплейного вектора pDisplay (Invitrogen, каталожный номер V66020). Его ген PDGFR и ген тус были удалены расщеплением NotI (NEB, каталожный номер R-0189S) / SfiI (NEB, каталожный номер R-0123S). MCS (Multiple Cloning Site, множественный сайт клонирования) получали амплификацией плазмиды вектора pDisplay с использованием следующих праймеров:

TGGGGCCCCAGCCGGCCAGATCT (SEQ ID NO: 1) и
ATAAGAATGCGGCCGCGTCGACCTGCA (SEQ ID NO: 2).

Эти праймеры имеют сайты рестрикции NotI/SfiI соответственно. Было проведено расщепление MCS по сайтам рестрикции NotI/SfiI и его вставка в указанный выше расщепленный вектор. Это привело к получению промежуточного продукта - вектора pDis.

В pDis удаляли ген F1 ori и вводили ген Oriр с применением следующего метода. Ген Oriр амплифицировали из вектора pTT5 (Biovetor, каталожный номер 3574108) с использованием следующих праймеров, содержащих сайт рестрикции SspI (NEB, каталожный номер R1032S):

5'-ATCGAGTCAATATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTAAGGAAC (SEQ ID NO: 3),
5'-CAGTCGATAATATTAAGAATTAATTCTCATGTTTGACAGCTTAT (SEQ ID NO: 4).

Затем ген Oriр расщепляли с использованием SspI и лигировали с вектором pDis, расщепленным SspI. Это приводило к получению вектора pDis1. Затем из вектора pDis1 удаляли ген резистентности нео посредством расщепления с использованием AvrII (NEB, каталожный номер R0174S). Ген резистентности hygro вводили амплификацией pCEP4 (Invitrogen, каталожный номер V04450) со следующими праймерами для включения сайта рестрикции AvrII: прямой праймер

5'-TAGCCTCCCCCTAGGGTGGGCGAAGAACTCCAGCATG (SEQ ID NO: 5),
5'-TTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAGATCGATCAAGAGACAGGATGAGGA (SEQ ID NO: 6).

После расщепления ген hygro вводили в вектор pDis1 с получением вектора pDis2.

ДНК-последовательность (SEQ ID NO: 7) была синтезирована компанией "GENEWIZ", Китай. Эта последовательность содержит, слева направо, ген SUMO (из вектора Champion™ pET SUMO, Invitrogen, каталожный номер K30001), человеческий ген Fc (обозначаемый далее Fc1, содержащий домен CH3-A), сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH), ген сигнального пептида (из вектора pDisplay), ген гемагглютинаина (HA) вируса гриппа человека (Genbank: NC_007362.1, аминокислоты №№98-106) и человеческий ген Fc (обозначаемый далее Fc2, содержащий домен CH3-B). На противоположных концах всей последовательности генов расположены два сайта рестрикции SfiI и PstI. Последовательность Fc, последовательность SUMO и последовательность HA были оптимизированы с учетом кодонов, наиболее распространенных у млекопитающих. Домен Fc1 имеет сайты рестрикции BglII/SacII, а домен Fc2 имеет сайты рестрикции BsrGI/SaII. Сайты рестрикции не меняют аминокислотные последовательности Fc. Последовательности ДНК и pDis2 расщепляли с использованием SfiI/PstI и затем лигировали в pDis2 с получением конечного вектора pDis3, как показано на фиг. 1.

2.2. Конструирование библиотеки гетеродимерных Fc pUC57-TCZHC (GENEWIZ, Китай) содержал последовательности природных человеческих Fc. Первые сайт-направленные случайные последовательности Fc были получены амплификацией pUC57-TCZHC с использованием вырожденных праймеров, в которых вырожденный кодон NNS, кодирующий аминокислоты в положении 366 и положении 399 Fc1, приводил к их случайной замене на естественные аминокислоты 20 различных типов. Прямой праймер представлял собой

TCCCAGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGTCTCCCTCANNSTGCCTGGTCAAGG
GATTCTACCCTTC (SEQ ID NO: 8),

а обратный праймер представлял собой

GTCCACGGTGAGCTTGGAGTACAGGAAGAAGGATCCGTCGCTSNACAGGACGGGGG
GGGTGTCTTT (SEQ ID NO: 9).

Второй ген Fc был амплифицирован из pUC57-TCZHC с использованием следующих праймеров: прямой праймер представлял собой

TACTCCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC (SEQ ID NO: 10),

а обратный праймер представлял собой

CGATCCAATCGATGGAAGATCTTCATCATTTGCCGGGGCTGAGGCTCAGGCT (SEQ ID NO: 11).

Для получения полноразмерного сайт-направленного случайного Fc1-фрагмента были использованы следующие перекрывающиеся праймеры:

5'-CAAGGGCCAGCCGCGGGAACCTCAAGTGTATACCCTCCCTCCCAGCCGGGATGAGC

TGACCAAGAACCAA (SEQ ID NO: 12),

5'-CGATCCAATCGATGGAAGATCTTCATCATTTGCCGGGGCTGAGGCTCAGGCT (SEQ ID NO: 13).

Fc1-фрагмент субклонировали в вектор pDis3 с использованием сайтов рестрикции BglII (NEB, каталожный номер R0144S) и SacII (NEB, каталожный номер R0157S). Затем полученной обессоленной конструкцией трансформировали штамм *E. coli* Top10 с использованием аппарата для электропорации клеток Bio-Rad Gene Pulser X.

Полученные трансформанты высевали непосредственно на селективную агаровую среду, содержащую 100 мг/л ампициллина. Размер мутантной библиотеки рассчитывали по числу колоний. Случайным образом отбирали 20 колоний и введение разных мутаций верифицировали секвенированием ДНК. Конструирование библиотеки сайт-направленных случайных мутантных Fc1 повторной электропорацией продолжали до достижения размера 10^5 .

Для выделения библиотеки сайт-направленных случайных мутантных Fc1 использовали набор для выделения плазмид (Qiagen, каталожный номер 27106). Полученную библиотеку использовали в качестве матрицы для конструирования библиотеки сайт-направленных случайных мутантных Fc1+Fc2. Сайт-направленный случайный Fc2-фрагмент клонировали в библиотеку Fc1 с использованием вырожденных праймеров, добавляя сайты рестрикции BsrGI и SalI со стороны 5'- и 3'-конца соответственно:

5'-GGCCAGCCCAGGGAACCTCAAGTGTACACCNNSCCTCCCAGCCGGGATGA GCTG, (SEQ ID NO: 14),

5'-GCCCTGTTGCCACCGGCTCTTGTCGACGGTGAGSNNGGASNNCAGGAAGA

AGGATCCGTCGCT (SEQ ID NO: 15).

В этих праймерах присутствуют сайты BsrGI и SalI, и данный метод приводил к введению 20 аминокислот в положения 351, 407 и 409 Fc с использованием кодона NNS. Проводили со-трансформацию штамма *E. Coli* Top10 Fc2-фрагментом и линейаризованным вектором Fc2 (расщеплением с использованием BsrGI (NEB, каталожный номер R3575L) и SalI (NEB, каталожный номер R3138L)) с использованием аппарата для электропорации клеток Bio-Rad Gene Pulser X.

Полученные трансформанты высевали непосредственно на селективную агаровую среду, содержащую 100 мг/л ампициллина. Конструирование библиотеки сайт-направленных случайных мутантов Fc1+Fc2 повторной электропорацией продолжали до достижения размера 3×10^8 . Методика конструирования библиотеки гетеродимерных Fc представлена на фиг. 2. Плазмиды библиотеки Fc1+Fc2 выделяли с использованием наборов QIAGEN Plasmid Plus 96 (Qiagen, каталожный номер 16181), случайно выбирая колонии с селективной агаровой среды.

Очищенными плазмидами трансфицировали клетки FreeStyle™ 293-F (Invitrogen, каталожный номер R79007) в 96-луночном планшете. В день, предшествующий трансфекции, клетки 293-F субкультивировали и размножали, давая им расти в течение ночи. В день трансфекции клетки собирали центрифугированием и ресуспендировали с использованием свежей экспрессионной среды FreeStyle™ 293 (Gibco, каталожный номер 12338001) до конечной плотности 200×10^5 жизнеспособных клеток на мл. Проводили транзиторную со-трансфекцию полученными плазмидами (конечная концентрация 36,67 мкг/мл) в указанных молярных отношениях с полиэтиленгликолем (25 кДа, конечная концентрация 55 мкг/мл, Alfa Aesar, каталожный номер 43896) с их смешиванием и инкубацией при 37°C в течение 1 ч. Добавляли свежую среду в количестве 19 объемов трансфекционной смеси и продолжали инкубацию. Супернатант клеточной культуры собирали через 5-6 дней после трансфекции.

Как показано на фиг. 3, в супернатанте присутствовали 5 структурных типов гетеродимерных Fc с двумя разными метками. Гетеродимеры выявляли посредством ELISA. Кратко, на 96-луночный планшет сорбировали антитело против HA (Abcam, каталожный номер ab181181) в карбонатном буфере, pH 9,6, и промывали с использованием PBST (Sigma, каталожный номер P-3563). Все неспецифические сайты связывания на поверхности планшета блокировали посредством PBST, содержащего 5% снятого молока. Планшет промывали с использованием PBST. Супернатант разводили в PBST, содержащем 1% BSA, и вносили в планшет, проводя инкубацию при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали с использованием PBST для удаления несвязанного образца. Антитело против SUMO (Abcam, каталожный номер ab179907), меченное биотином, разводили в PBST, содержащем 5% снятого молока, и вносили в планшет, после чего проводили инкубацию при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали с использованием PBST. Затем вторичное антитело, стрептомицин авидин, меченный пероксидазой хрена (Abcam, каталожный номер 59653), разводили в PBST, содержащем 5% снятого молока, и вносили в планшет, после чего проводили инкубацию при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали с использованием PBST. Вносили TMB (BD OptEIA, каталожный номер 555214) для появления окраски под действием фермента на 10 мин. Для остановки окрашивания вносили 1 М H₂SO₄. Поглощение при 450 нм определяли с использованием устройства для прочтения микропланшетов.

В каждом раунде скрининга отбирали по 20 клонов с наибольшими значениями OD и размножали соответствующие клетки в 96-луночном планшете. Белки очищали из культуральных супернатантов с применением хроматографии на агарозе с белком A (ACRO Biosystems, каталожный номер MA0422-S1) и анализировали посредством SDS-PAGE. После многих раундов скрининга получали клон с наибольшим выходом гетеродимеризации, который верифицировали секвенированием ДНК. Результаты показаны в табл. 2 ниже. Аминокислотные последовательности положительных клонов показаны в SEQ ID NO:16-31.

Таблица 2

Результаты секвенирования Fc1 и Fc2

	Fc1			Fc2				Доля гетеродимера (SDS-PAGE, с применением Quantity One)
	366	399	SEQ ID NO:	351	407	409	SEQ ID NO:	
№1	L	C	SEQ ID NO:16	G	L	C	SEQ ID NO:17	61,45
№6	L	C	SEQ ID NO:18	Y	A	P	SEQ ID NO:19	57,59
№23	V	T	SEQ ID NO:20	K	T	Q	SEQ ID NO:21	52,13
№41	L	A	SEQ ID NO:22	W	H	R	SEQ ID NO:23	52,33
№46	P	N	SEQ ID NO:24	V	P	S	SEQ ID NO:25	47,77
№53	P	I	SEQ ID NO:26	P	F	F	SEQ ID NO:27	42,97
№65	W	G	SEQ ID NO:28	D	P	S	SEQ ID NO:29	47,30
№76	L	R	SEQ ID NO:30	E	L	V	SEQ ID NO:31	69,73

Пример 3. Конструирование вектора для экспрессии гетеродимерных антител.

Были сконструированы векторы экспрессии X0GC, кодирующие тяжелую цепь и легкую цепь антитела против HER2, последовательности переменных областей которого были взяты с <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00072>. Был использован константный домен тяжелой цепи человеческого IgG1 (Fc1). Нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную легкую цепь (V_L), представляла собой SEQ ID NO: 32, и соответствующая аминокислотная последовательность представляла собой SEQ ID NO: 33. Нуклеотидная последовательность, кодирующая константный домен легкой цепи (C_L), представляла собой SEQ ID NO: 34, и соответствующая аминокислотная последовательность представляла собой SEQ ID NO: 35. Нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную тяжелую цепь (V_H), представляла собой SEQ ID NO: 36, и соответствующая аминокислотная последовательность представляла собой SEQ ID NO: 37. Нуклеотидная последовательность, кодирующая константную тяжелую цепь (C_H), представляла собой SEQ ID NO: 38, и соответствующая аминокислотная последовательность представляла собой SEQ ID NO: 39.

V_L, C_L, V_H, C_H амплифицировали полимеразной цепной реакцией (ПЦР), как описано далее. Реакционная система представляла собой следующее: H₂O, 8,9 мкл; 5× буфер для ДНК-полимеразы Phusion, 4 мкл; 1 mM dNTP, 4 мкл; прямой праймер, 1 мкл; обратный праймер, 1 мкл; ДНК-полимераза Phusion (NEB, каталожный номер F-530L), 0,1 мкл; и матрица, 1 мкл. Продукты ПЦР переменных и константных фрагментов разделяли электрофорезом в 1,5%-м агарозном геле и выделяли с использованием набора для очистки ДНК (Promega, каталожный номер A9282). Следующий раунд ПЦР проводили с использованием выделенных переменных и константных фрагментов в качестве матриц в сочетании с прямыми праймерами переменных фрагментов и обратными праймерами константных фрагментов. После выделения продуктов получали полноразмерные фрагменты легкой цепи или тяжелой цепи. Полученные фрагменты и вектор X0GC расщепляли и связывали друг с другом по одинаковым сайтам рестрикции EcoRI (NEB, каталожный номер R3101L)/HindIII (NEB, каталожный номер R3104L). Система расщепления представляла собой следующее: 10× реакционный буфер, 32 мкл; EcoRI и HindIII, 0,5 мкл; расщепляемые фрагменты, 3 мкл; H₂O, 14,5 мкл. Взаимодействие проводили при 37°C в течение 3 ч. Система лигирования представляла собой следующее: 10× буфер для ДНК-лигазы T4, 2 мкл; ДНК-лигаза T4 (New England Biolabs, каталожный номер M0202V), 0,5 мкл; лигируемые фрагменты, 3 мкл; лигируемый вектор, 3 мкл; H₂O, 11,5 мкл. Взаимодействие проводили при комнатной температуре в течение 12 ч. Полученными конструкциями трансформировали штамм E. Coli DH5α (TIANGEN, каталожный номер CB104, Китай), после чего получали плазмиду с тяжелой цепью (Fc1) или легкой цепью антитела для экспрессии в эукариотической клетке.

Были сконструированы векторы экспрессии X0GC, кодирующие тяжелую цепь антитела против HER2. Последовательность константной области тяжелой цепи представляла собой последовательность IgG1 (Fc2) (SEQ ID NO: 40). Аминокислотная последовательность представляла собой SEQ ID NO: 41. Экспрессионную плазмиду тяжелой цепи антитела использовали для экспрессии тяжелой цепи антитела

(Fc2) у эукариот.

Были сконструированы векторы экспрессии X0GC, кодирующие тяжелую цепь и легкую цепь антитела против CD20. Вариабельные последовательности антитела были взяты из US 5736137, полностью включенной сюда посредством ссылки. Последовательности константной области тяжелой цепи были взяты из человеческого IgG1 (Fc1). Нуклеотидная последовательность, кодирующая вариабельную легкую цепь (V_L), представляла собой SEQ ID NO: 42, и соответствующая аминокислотная последовательность представляла собой SEQ ID NO: 43. Аминокислотная последовательность константной легкой цепи (C_L) представляла собой SEQ ID NO: 35. Нуклеотидная последовательность, кодирующая вариабельную тяжелую цепь (V_H), представляла собой SEQ ID NO: 44, и соответствующая аминокислотная последовательность представляла собой SEQ ID NO: 45. Нуклеотидная последовательность, кодирующая константную тяжелую цепь (C_H), представляла собой SEQ ID NO: 46 или 47, соответствующая аминокислотная последовательность представляла собой SEQ ID NO: 48 или 49. Вектор экспрессии получали, как описано выше. Экспрессионную плазмиду тяжелой цепи или легкой цепи антитела использовали для экспрессии тяжелой цепи (Fc1 или Fc2) или легкой цепи у эукариот.

Были сконструированы векторы экспрессии X0GC, кодирующие тяжелую цепь и легкую цепь антитела против Trp-2, как описано выше. Вариабельные последовательности антитела были взяты из WO 2003/074566, полностью включенной сюда посредством ссылки. Последовательность константной тяжелой цепи представляла собой последовательность человеческого IgG1 (Fc1). Нуклеотидная последовательность, кодирующая вариабельную легкую цепь (V_L), представляла собой SEQ ID NO: 50, и аминокислотная последовательность представляла собой SEQ ID NO: 51. Аминокислотная последовательность константной легкой цепи (C_L) представляла собой SEQ ID NO: 35. Нуклеотидная последовательность вариабельной тяжелой цепи (V_H), представляла собой SEQ ID NO: 52, и соответствующая аминокислотная последовательность представляла собой SEQ ID NO: 53. Нуклеотидная последовательность, кодирующая константную тяжелую цепь (C_H), представляла собой SEQ ID NO: 54, аминокислотная последовательность представляла собой SEQ ID NO: 55.

Были сконструированы векторы экспрессии X0GC, кодирующие тяжелую цепь и легкую цепь антитела против PD-L1, как описано выше. Вариабельные последовательности антитела были взяты из US 2010/0203056, полностью включенной сюда посредством ссылки. Последовательности константной области тяжелой цепи были взяты из человеческого IgG1 (Fc1). Нуклеотидная последовательность вариабельной легкой цепи представляла собой SEQ ID NO: 56, аминокислотная последовательность вариабельной легкой цепи представляла собой SEQ ID NO: 57, аминокислотная последовательность константной легкой цепи представляла собой SEQ ID NO: 35, нуклеотидная последовательность вариабельной тяжелой цепи представляла собой SEQ ID NO: 58, аминокислотная последовательность вариабельной тяжелой цепи представляла собой SEQ ID NO: 59, нуклеотидная последовательность константной тяжелой цепи представляла собой SEQ ID NO: 60, и аминокислотная последовательность константной тяжелой цепи представляла собой SEQ ID NO: 61.

Были сконструированы векторы экспрессии X0GC, кодирующие слитую последовательность scFv против CD3 и человеческого IgG1 (Fc2), как описано выше. Вариабельные последовательности антитела были взяты из US 7112324, полностью включенной сюда посредством ссылки. Последовательность константной области тяжелой цепи представляла собой последовательность человеческого IgG1 (Fc2). Нуклеотидная последовательность вариабельного домена представляла собой SEQ ID NO: 62, аминокислотная последовательность вариабельного домена представляла собой SEQ ID NO: 63, нуклеотидная последовательность константного домена представляла собой любую из SEQ ID NO: 64-67, и аминокислотная последовательность константного домена представляла собой любую из SEQ ID NO: 68-71. Экспрессионную плазмиду слитых последовательностей scFv против CD3 и человеческого IgG1 (Fc2) использовали для экспрессии слитых последовательностей scFv против CD3 и человеческого IgG1 (Fc2) у эукариот.

Пример 4. Экспрессия гетеродимерных антител.

Двумя векторами экспрессии тяжелой и легкой цепей антитела трансфицировали клетки FreeStyle™ 293-F (FreeStyle™ 293-F Cells, каталожный номер R79007, Invitrogen). В день, предшествующий трансфекции, клетки 293-F субкультивировали и размножали, давая им расти в течение ночи. В день трансфекции клетки собирали центрифугированием и ресуспендировали с использованием свежей экспрессионной среды FreeStyle™ 293 (Gibco, каталожный номер 12338001) до конечной плотности 200×10 жизнеспособных клеток на мл. Проводили транзиторную со-трансфекцию полученными плазмидами (конечная концентрация 36,67 мкг/мл) в указанных молярных отношениях с полиэтиленимином (25 кДа, конечная концентрация 55 мкг/мл, Alfa Aesar, каталожный номер 43896) с их смешиванием и инкубацией при 37°C и 120 об/мин в течение 1 ч. Затем добавляли свежую среду в количестве 19 объемов трансфекционной смеси и продолжали инкубацию. Супернатант клеточной культуры собирали через 5-6 дней после трансфекции.

Клетки также трансфицировали тремя векторами экспрессии. Проводили совместную трансфекцию тяжелой цепью (Fc1 человеческого IgG1) антитела А, легкой цепью антитела А и слитыми последовательностями scFv антитела В' и Fc2 человеческого IgG1. В супернатанте клеточной культуры присутст-

вовали гомодимер Fc1, гомодимер scFv-Fc2 и гетеродимер Fc1/scFv-Fc2. Гетеродимер Fc1/scFv-Fc2 был основным продуктом в силу эффекта взаимного отталкивания Fc1 и Fc2. Кроме того, Fc1 и Fc2 имеют выраженную тенденцию к образованию гетеродимеров.

По результатам ELISA, выходы Fc1 против HER2 и Fc2 против CD3 составили 70-100 мг/л. Перед очисткой на колонках супернатант фильтровали через 0,22 мкм фильтр при 4°C для удаления клеточного детрита.

Пример 5. Очистка гетеродимерного антитела "антитело против HER2/scFv против CD3".

Общая структура гетеродимерного антитела "антитело против HER2/scFv против CD3" показана на фиг. 4. Белки очищали из культуральных супернатантов с использованием Protein-A Sepharose Fast Flow (внутренний диаметр 16 мм, 22 мл, GE Healthcare). Полученные белки концентрировали с использованием ультрацентрифужной пробирки (отсечение по молекулярной массе 10 кДа) и заменяли буфер на раствор PBS.

Затем добавляли 3 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до конечной концентрации 1 М с половиной объема раствора. Белки разводили буфером А (20 мМ фосфата натрия, 1 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7,0).

Также применяли описанную ниже очистку с использованием системы для очистки белка АКТА Explorer 100 (GE Healthcare). Белки очищали с использованием Source Phenyl (внутренний диаметр 16 мм, 22 мл, GE Healthcare). Образцы белка наносили на колонку, предварительно уравновешенную буфером А (20 мМ Na_3PO_4 , 1 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7,0). Скорость потока составляла 3 мл/мин. Затем колонку уравновешивали буфером А и промывали 15 объемами колонки с градиентом от буфера А (0% В) до 100% буфера В (20 мМ фосфата натрия, pH 7,0) в течение 180 мин. Скорость потока составляла 2 мл/мин. Фракции, показанные на фиг. 5, объединяли, концентрировали с использованием ультрацентрифужной пробирки (отсечение по молекулярной массе 10 кДа) и заменяли буфер на раствор PBS. Белки фильтровали через 0,22 мкм и хранили при 4°C. Очищенный белок анализировали посредством SDS-PAGE. Результат показан на фиг. 6. По результатам эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SEC-HPLC), степень чистоты составила 97,65% (фиг. 7).

Пример 6. Анализ стабильности гетеродимерного биспецифичного антитела "антитело против HER2/scFv против CD3".

Герметично закрытые образцы гетеродимера "антитело против HER2/scFv против CD3" (1 мг/мл и 10 мг/мл) хранили в инкубаторе при 40°C (BINDER, KBF240). Стабильность анализировали с использованием образцов объемом 20 мкл в разных временных точках (исходно (0 сутки), 1 сутки, 2 сутки, 5 сутки, 7 сутки) с применением высокоэффективной эксклюзионной жидкостной хроматографии (SEC-HPLC). Условия SEC-HPLC были следующими: (1) хроматографическая колонка: TSKgel G3000SWxl (Tosoh Bioscience), 5 мкм, 7,8 мм×30 см; (2) подвижная фаза: 5 мМ PBS, 150 мМ NaCl, pH 6,7; (3) скорость потока: 0,6 мл/мин; (4) длина волны при УФ-детекции: 280 нм; (5) время экспозиции: 30 мин. Используемый прибор представлял собой хроматограф Agilent 1200 Infinity, а для построения диаграмм и расчета доли остаточного мономера применяли ChemStation Agilent. Как показано на фиг. 8, в условиях эксперимента при 40°C, гетеродимер "антитело против HER2/scFv против CD3" не был подвержен существенной агрегации. Полученные данные продемонстрировали, что гетеродимер "антитело против HER2/scFv против CD3" обладает хорошей температурной стабильностью. Пример 7 - Связывающая активность гетеродимерного биспецифичного антитела "антитело против HER2/scFv против CD3" в отношении FcRn. Активность связывания FcRn гетеродимером "антитело против HER2/scFv против CD3" анализировали посредством ELISA. Кратко, на планшет для ELISA сорбировали гетеродимер "антитело против HER2/scFv против CD3" и контрольные образцы в карбонатном/бикарбонатном буфере (pH 9,6) в течение ночи при 4°C. Планшет промывали 5 раз с использованием PBST (pH 6,0). В каждую лунку добавляли по 300 мкл PBST, содержащего 0,5% BSA, для блокировки планшета и планшет инкубировали по меньшей мере 1 ч при 25°C. Планшет промывали, как описано выше, затем в каждую лунку вносили по 100 мкл FcRn с his-меткой (Sino Biological, каталожный номер CT009-H08H), 1 мкг/мл, разведенный в 0,5% BSA в PBST, и планшет инкубировали в течение 2 ч при 25°C. Планшет промывали, как описано выше, затем в каждую лунку вносили по 100 мкл мышиного антитела против his (CWBIO, каталожный номер CW0228), разведение 1:5000 в 0,5% BSA в PBST, и проводили инкубацию в течение 1 ч при 25°C. Планшет промывали, как описано выше, затем в каждую лунку вносили по 100 мкл антитела против мышиного IgG (Abcam, каталожный номер AB7068), меченного пероксидазой хрена (HRP), и проводили инкубацию в течение 1 ч при 25°C. Планшет промывали, как описано выше, в каждую лунку вносили по 100 мкл TMB и проводили окрашивание в течение 10 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали, добавляя в каждую лунку по 100 мкл 1 М H_2SO_4 . Оптическую плотность при 450 нм определяли с использованием устройства для прочтения микропланшетов. Как показано на фиг. 9, гетеродимер "антитело против HER2/scFv против CD3" связывается с FcRn.

Пример 8. Связывающая активность гетеродимерного биспецифичного антитела "антитело против HER2/scFv против CD3" in vitro.

Гетеродимер "антитело против HER2/scFv против CD3" анализировали проточной цитометрией (FACS) на предмет связывающей активности в отношении клеток SK-BR-3 с высокой экспрессией HER2

и клеток Jurkat с высокой экспрессией CD3.

Клетки SK-BR-3 и клетки Jurkat собирали и промывали один раз холодным аналитическим буфером, представляющим собой холодный PBS (GIBCO, каталожный номер 14190-235), содержащий 2% FBS (Hyclone, каталожный номер SH30084.03), соответственно. Затем аликвоты клеток SK-BR-3 (1×10^6 на пробирку) ресуспендировали в холодном аналитическом буфере (200 мкл DPBS, содержащего 2% FBS) и инкубировали с 0,5 нМ гетеродимера "антитело против HER2/scFv против CD3", или гомодимерного тетравалентного антитела против HER2/CD3, или антитела против HER2, или изотипического контроля (человеческий иммуноглобулин, Jiangxi Boya Bio-Pharmaceutical, разрешение №S19993012, Китай) на льду в темноте в течение 30 мин. Аликвоты клеток Jurkat обрабатывали сходным образом, за исключением того, что концентрация этих образцов была изменена на 5 нМ. По окончании инкубации клетки промывали два раза холодным аналитическим буфером, затем ресуспендировали в холодном аналитическом буфере и инкубировали с разведенным в 50 раз конъюгатом антитела против человеческого IgG с FITC (ZSGB-Bio, каталожный номер ZF0306, Китай) на льду в темноте в течение 30 мин. По окончании инкубации клетки промывали два раза холодным аналитическим буфером и затем ресуспендировали в холодном PBS. Проточную цитометрию проводили с использованием FACS Calibur (Becton Dickinson). Результаты представлены в таблицах 3 и 4. Полученные результаты продемонстрировали, что гетеродимерная конструкция "антитело против HER2/scFv против CD3" связывала свои антигены HER2 и CD3 с хорошей активностью.

Таблица 3

Связывающая активность в отношении клеток SK-BR-3 с
высокой экспрессией HER2

Образец	Средняя интенсивность флуоресценции (Mean Fluorescence Intensity, MFI)
Изотипический контроль	2,88
Антитело против HER2 (герцептин)	20,55
Гетеродимер «антитело против HER2/scFv против CD3»	14,16

Таблица 4

Связывающая активность в отношении клеток Jurkat с
высокой экспрессией CD3

Образец	MFI
Изотипический контроль	3,16
Антитело против HER2 (герцептин)	3,16
Гетеродимер «антитело против HER2/scFv против CD3»	5,19

Пример 9. Связывающая активность гетеродимерного биспецифичного антитела "антитело против HER2/scFv против CD3" в отношении HER2 и CD3 одновременно.

Гетеродимерные конструкции "антитело против HER2/scFv против CD3" анализировали посредством FACS на предмет связывающей активности в отношении HER2 и CD3 одновременно с использованием клеток SK-BR-3 и клеток Jurkat.

Клетки SK-BR-3 окрашивали, следуя инструкции по применению набора PKH26 (Sigma, каталожный номер SLBH4568V). Кратко, клетки SK-BR-3 собирали, промывали один раз в среде, свободной от сыворотки, затем готовили суспензию клеток SK-BR-3, 2×10^7 клеток/мл, и разводили PKH26 до 4 мкМ, соответственно, с использованием разбавителя С из набора PKH26. Затем их смешивали 1:1 с получением смеси, где плотность клеток составляла 1×10^7 клеток/мл, а концентрация PKH26 - 2 мкМ. После этого смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 1 мин и затем инкубировали с равным объемом FBS в течение 1 мин для остановки окрашивания. Затем смесь центрифугировали при 400 g в течение 10 мин, промывали два раза полной средой, после чего ресуспендировали в полной среде. Клетки Jurkat окрашивали, следуя инструкции по применению набора CFSE (Life Technology, каталожный номер C34554). Кратко, CFSE разводили до рабочей концентрации 0,5 мкМ в PBS и предварительно нагревали

до 37°C. Клетки Jurkat центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин, затем ресуспендировали в предварительно нагретом рабочем растворе CFSE и инкубировали при 37°C в течение 15 мин. Окрашенные клетки Jurkat центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин, затем ресуспендировали в полной среде и инкубировали в течение 30 мин. После инкубации клетки промывали один раз полной средой и затем ресуспендировали в полной среде.

Окрашенные выше клетки SK-BR-3 и клетки Jurkat собирали центрифугированием и промывали один раз холодным аналитическим буфером, представляющим собой холодный PBS, содержащий 2% FBS. Клетки ресуспендировали при плотности клеток 5×10^5 клеток/мл в холодном аналитическом буфере. Клетки SK-BR-3 и клетки Jurkat смешивали в соотношении 1:1 и в каждую пробирку пипеткой переносили аликвоты смесей по 100 мкл (конкретно, по $2,5 \times 10^5$ клеток SK-BR-3 и $2,5 \times 10^5$ клеток Jurkat). Затем добавляли по 100 мкл образцов гетеродимера "антитело против HER2/scFv против CD3" или изотипического контроля (человеческий иммуноглобулин, Jiangxi Boya Bio-Pharmaceutical, S19993012). Разведение в аналитическом буфере, конечная концентрация 5 нМ. Пробирки инкубировали в течение 30 мин на льду в темноте, промывали два раза холодным аналитическим буфером и затем ресуспендировали в 500 мкл холодного PBS. Проточную цитометрию проводили с использованием FACS Calibur.

Как показано на фиг. 10, гетеродимер "антитело против HER2/scFv против CD3" может индуцировать объединение клеток SK-BR-3 и Jurkat посредством одновременного связывания с клетками SK-BR-3 с высокой экспрессией HER2 и клетками Jurkat с высокой экспрессией CD3, и это означает, что гетеродимер может привлекать Т-клетки к опухолевым клеткам и приводить к повышению активности по уничтожению раковых клеток.

Пример 10. Цитотоксичность гетеродимерного биспецифичного антитела "антитело против HER2/scFv против CD3" в отношении опухолевых клеток *in vitro*.

Клетки-мишени (BT-474 и SK-BR-3) собирали и ресуспендировали в полной среде (RPMI 1640, содержащей 10% FBS) при плотности клеток 2×10^5 клеток/мл. Клетки-мишени BT-474 и SK-BR-3 высевали в 96-луночные планшеты, 50 мкл на лунку (1×10^4 клеток на лунку), соответственно, после чего вносили серийно разведенные образцы гетеродимера "антитело против HER2/scFv против CD3" и контрольные образцы с полной средой в количестве 100 мкл на лунку. Согласно предварительному эксперименту, отношение эффекторы/мишени (effect v.s. target, E/T) было определено как 20:1. Клетки-эффекторы (человеческие PBMC, Lonza, каталожный номер CC-2702) ресуспендировали в полной среде при плотности клеток 4×10^5 клеток/мл и затем высевали по 50 мкл в каждую лунку (2×10^5 клеток на лунку). Культуральный планшет инкубировали в течение 4 суток в CO₂-инкубаторе при 37°C. После инкубации отбирали супернатант и клетки промывали два раза с использованием 200 мкл DPBS для удаления эффекторных клеток. Добавляли 100 мкл полной среды и 20 мкл MTS и затем проводили инкубацию в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 2-3 ч. Поглощение при 490 нм (значение OD) определяли с использованием устройства для прочтения микропланшетов. Цитотоксичность рассчитывали следующим образом:

$$\text{цитотоксичность} = \frac{\text{OD}_{\text{контроль}} - \text{OD}_{\text{эксперимент}}}{\text{OD}_{\text{контроль}}}$$

Как показано на фиг. 11, гетеродимерная конструкция "антитело против HER2/scFv против CD3" уничтожала клетки рака молочной железы SK-BR-3 и BT-474 с высокой экспрессией HER2 зависимым от концентрации образом. Цитотоксичность этой конструкции была намного выше, чем у герцептина (mAb против HER2), демонстрируя высокую активность по уничтожению опухолевых клеток.

Пример 11. Исследование фармакокинетики гетеродимерного биспецифичного антитела "антитело против HER2/scFv против CD3" у мышей.

Фармакокинетику гетеродимера "антитело против HER2/scFv против CD3" исследовали у самок мышей BALB/c в возрасте 8 недель, приобретенных у Beijing HFK Bioscience Co., Ltd. После одной недели акклиматизации мышей случайным образом распределяли на две группы по 21 мышь в каждой. Мышам проводили однократную внутрибрюшинную инъекцию моноклонального антитела герцептина или гетеродимерного биспецифичного антитела "антитело против HER2/scFv против CD3", соответственно, в дозе 20 нмоль/кг. Образцы крови получали из ретроорбитального синуса в пробирки без антикоагулянта в следующих временных точках: перед введением, через 1, 3, 6, 10, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 216, 264, 312 ч после введения. У каждой мыши кровь получали в двух временных точках. Для каждой временной точки использовали по 2 мыши. Образцам крови давали свернуться в течение 30-60 мин при комнатной температуре и центрифугировали их при 3000 об/мин в течение 10 мин, после чего отбирали образцы сыворотки и хранили их при -80°C для дальнейшего анализа.

Образцы крови анализировали посредством ELISA для определения в них концентрации герцептина и гетеродимера против HER2/CD3. Кратко, на 96-луночный аналитический планшет NuncMaxisorp сорбировали рекомбинантный человеческий HER2 (Sino Biological, каталожный номер 10004-H08H) в количестве 100 мкл на лунку, 1 мкг/мл в карбонатном/бикарбонатном буфере (pH 9,6) в течение ночи при 4°C. Планшет промывали 5 раз с использованием PBST (Sigma, каталожный номер P-3563). В каждую лунку добавляли по 300 мкл 5%-го снятого молока в PBST для блокировки планшета и планшет инкуби-

ровали по меньшей мере 1 ч при 25°C. Планшет промывали, как описано выше, затем в каждую лунку вносили образцы сыворотки, разведенные в 10%-й объединенной мышиной сыворотке, 1%-й BSA в PBST, по 100 мкл на лунку, и планшет инкубировали в течение 1 ч при 25°C. Планшет промывали, как описано выше, затем в каждую лунку вносили по 100 мкл антитела против человеческого IgG, конъюгированного с HRP (Chemicon, каталожный номер AP309P), разведение 1:2000 в 5%-м снятом молоке в PBST, и проводили инкубацию в течение 1 ч при 25°C. Планшет промывали, как описано выше, затем в каждую лунку вносили по 100 мкл TMB (BD OptEIA, каталожный номер 555214) и проводили окрашивание в течение 10 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали, добавляя в каждую лунку по 100 мкл 1 M H₂SO₄. Оптическую плотность при 450 нм определяли с использованием устройства для прочтения микропланшетов.

Как показано на фиг. 12, гетеродимер "антитело против HER2/scFv против CD3" продемонстрировал сходный с герцептином ФК-профиль после однократного внутрибрюшинного введения мышам (20 нмоль/кг). Фармакокинетические параметры гетеродимера "антитело против HER2/scFv против CD3" были следующими: период полувыведения $t_{1/2}$ составляет 129 ч; AUC_{last} составляет 30611 нМ*ч; T_{max} составляет 3 ч; C_{max} составляет 264 нМ; Vd составляет 85 мл/кг; CL составляет 0,45 мл/ч/кг; MRT_{last} составляет 88 ч. Резюме по способу получения гетеродимерной конструкции "антитело против HER2/scFv против CD3" представлено в табл. 5 ниже.

Таблица 5

Таблица 5	HER2/CD3			
Степень чистоты	99,7%			
Стабильность	Стабильна по меньшей мере 7 суток при 40°C			
Связывающая активность	HER2	MFI = 14,16 (герцептин: MFI = 20,55)		
	CD3	MFI = 5,19	(бивалентное	HER2/CD3: MFI = 8,17)
Объединение клеток	Подтверждено объединением клеток SK-BR-3 и Jurkat			

Пример 12. Очистка гетеродимерного биспецифичного антитела "антитело против Троп-2/scFv против CD3".

Полученный культуральный супернатант очищали, как описано в примере 5. Очищенный продукт анализировали посредством SDS-PAGE. Результат показан на фиг. 13. Степень чистоты гетеродимерного продукта "антитело против Троп-2/scFv против CD3" превышала 95%.

Пример 13. Стабильность и связывающая активность гетеродимерного биспецифичного антитела "антитело против Троп-2/scFv против CD3" *in vitro*.

Активность связывания Троп-2 гетеродимерными конструкциями "антитело против Троп-2/scFv против CD3" анализировали посредством ELISA. Кратко, на 96-луночный планшет для ELISA сорбировали рекомбинантный человеческий Троп-2 (Sino Biological, каталожный номер 10428-H08H) в количестве 100 мкл на лунку, 1 мкг/мл в карбонатном/бикарбонатном буфере (pH 9,6) в течение ночи при 4°C. Планшет промывали 5 раз с использованием PBST. В каждую лунку добавляли по 300 мкл 1%-го BSA в PBST для блокировки планшета и планшет инкубировали по меньшей мере 1 ч при 25°C. Планшет промывали, как описано выше, затем в каждую лунку вносили образцы сыворотки, разведенные в 1%-м BSA в PBST, по 100 мкл на лунку, и планшет инкубировали в течение 1 ч при 25°C. Планшет промывали, как описано выше, затем в каждую лунку вносили по 100 мкл антитела против человеческого IgG, конъюгированного с HRP (Chemicon, каталожный номер AP309P), разведение 1:2000 в 1%-м BSA в PBST, и проводили инкубацию в течение 1 ч при 25°C. Планшет промывали, как описано выше, затем в каждую лунку вносили по 100 мкл TMB (BD OptEIA, каталожный номер 555214) и проводили окрашивание в течение 10 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали, добавляя в каждую лунку по 100 мкл 1 M H₂SO₄. Оптическую плотность при 450 нм определяли с использованием устройства для прочтения микропланшетов. Как показано на фиг. 14, гетеродимерная конструкция "антитело против Троп-2/scFv против CD3" обладает высокой аффинностью связывания с Троп-2. Активность связывания CD3 гетеродимерными конструкциями "антитело против Троп-2/scFv против CD3" анализировали посредством FACS с использованием клеток Jurkat с высокой экспрессией CD3. FACS проводили, как описано в Примере 8. Как показано в табл. 6, гетеродимерная конструкция "антитело против Троп-2/scFv против CD3" связывалась с клетками Jurkat с высокой аффинностью, что указывает на ее хорошую связывающую активность в отношении CD3.

Таблица 6

Связывающая активность в отношении клеток
Jurkat с высокой экспрессией CD3

Образец	MFI
Изотипический контроль	3,34
mAb против Tgp-2	3,10
Гетеродимер «антитело против Tgp-2/scFv против CD3»	17,51

Пример 14. Связывающая активность гетеродимерного биспецифичного антитела "антитело против Tgp-2/scFv против CD3" в отношении Tgp-2 и CD3 одновременно.

Гетеродимер "антитело против Tgp-2/scFv против CD3" анализировали посредством FACS на предмет связывающей активности в отношении Tgp-2 и CD3 одновременно с использованием клеток VxPC-3 и клеток Jurkat. FACS проводили, как описано в Примере 9 выше. Клетки VxPC-3 окрашивали, следуя инструкции по применению набора PKH26, а клетки Jurkat окрашивали с использованием набора CFSE. Как показано на фиг. 15, посредством одновременного связывания с клетками VxPC-3 с высокой экспрессией Tgp-2 и клетками Jurkat с высокой экспрессией CD3 гетеродимер "антитело против Tgp-2/scFv против CD3" может индуцировать объединение клеток VxPC-3 и Jurkat, и это означает, что гетеродимер может привлекать Т-клетки к опухолевым клеткам и приводить к повышению активности по уничтожению раковых клеток.

Пример 15. Цитотоксичность гетеродимерного биспецифичного антитела "антитело против Tgp-2/scFv против CD3" в отношении опухолевых клеток *in vitro*.

Клетки-мишени (H1650 и VxPC-3) собирали и ресуспендировали в полной среде (RPMI 1640, содержащей 10% FBS) при плотности клеток 1×10^5 клеток/мл. Клетки-мишени H1650 и VxPC-3 высевали в 96-луночные планшеты, 50 мкл на лунку (5×10^3 клеток на лунку), соответственно, после чего вносили серийно разведенные образцы гетеродимера "антитело против Tgp-2/scFv против CD3" и контрольные образцы с полной средой в количестве 100 мкл на лунку. Клетки-эффекторы (человеческие PBMC, Lonza, каталожный номер CC-2702) ресуспендировали в полной среде при плотности клеток 2×10^6 или $0,5 \times 10^6$ клеток/мл и затем высевали по 50 мкл в каждую лунку (1×10^5 или $0,25 \times 10^5$ клеток на лунку). Культуральный планшет инкубировали в течение 3 суток в CO₂-инкубаторе при 37°C. После инкубации отбирали супернатант и клетки промывали два раза с использованием 200 мкл DPBS для удаления эффекторных клеток. Добавляли 100 мкл полной среды и 20 мкл MTS и полученный образец инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 2-3 ч. Поглощение при 490 нм (значение OD) определяли с использованием устройства для прочтения микропланшетов. Цитотоксичность рассчитывали следующим образом:

$$\text{цитотоксичность} = \frac{\text{OD}_{\text{контроль}} - \text{OD}_{\text{эксперимент}}}{\text{OD}_{\text{контроль}}}$$

Как показано на фиг. 16 (с эффекторными клетками), гетеродимер "антитело против Tgp-2/scFv против CD3" уничтожал раковые клетки с высокой экспрессией Tgp-2 (клетки немелкоклеточного рака легкого H1650 и клетки рака поджелудочной железы человека VxPC-3) зависимым от концентрации образом. Активность биспецифичного антитела по уничтожению клеток была намного выше, чем у mAb против Tgp-2, демонстрируя высокую активность по уничтожению опухолевых клеток.

Пример 16. Исследование фармакокинетики гетеродимерного биспецифичного антитела "антитело против Tgp-2/scFv против CD3" у мышей.

Фармакокинетику гетеродимера "антитело против Tgp-2/scFv против CD3" исследовали у самок мышей BALB/c в возрасте 8 недель, приобретенных у Beijing HFK Bioscience Co., Ltd. Введение, сбор образцов крови и аналитический метод были такими же, как описано в Примере 11 выше. Образцы крови анализировали посредством ELISA с Tgp-2 (Sino Biological, каталожный номер 10428-H08H) для определения в них концентрации гетеродимера "антитело против Tgp-2/scFv против CD3". Как показано на фиг. 17, гетеродимер "антитело против Tgp-2/scFv против CD3" продемонстрировал сходный с антителом против Tgp-2 ФК-профиль после однократного внутрибрюшинного введения мышам (20 нмоль/кг). Фармакокинетические параметры гетеродимера "антитело против Tgp-2/scFv против CD3" были следующими: период полувыведения $t_{1/2}$ составляет 165 ч; AUC_{last} составляет 26072 нМ*ч; T_{max} составляет 6 ч; C_{max} составляет 203 нМ; Vd составляет 107 мл/кг; CL составляет 0,45 мл/ч/кг; MRT_{last} составляет 92 ч.

Пример 17. Очистка гетеродимерного биспецифичного антитела "антитело против CD20/scFv против CD3".

Полученный культуральный супернатант очищали, как описано в примере 5 выше. Очищенный продукт анализировали посредством SDS-PAGE. Результат показан на фиг. 18. Степень чистоты гетеродимерного продукта "антитело против CD20/scFv против CD3" превышала 95%.

Пример 18. Стабильность и связывающая активность гетеродимерного биспецифичного антитела "антитело против CD20/scFv против CD3" *in vitro*.

Герметично закрытые образцы гетеродимера "антитело против CD20/scFv против CD3" (1 мг/мл и 10 мг/мл) хранили в инкубаторе при 40°C (BINDER, KBF240). Стабильность анализировали с использованием образцов объемом 20 мкл в разных временных точках (исходно (0 сутки), 1 сутки, 3 сутки, 6 сутки) с применением высокоэффективной эксклюзионной жидкостной хроматографии (SEC-HPLC). Как показано на фиг. 19, в условиях эксперимента при 40°C, существенной агрегации гетеродимера "антитело против CD20/scFv против CD3" не было. Полученные данные продемонстрировали, что гетеродимерная конструкция "антитело против CD20/scFv против CD3" обладала хорошей температурной стабильностью. Активность связывания CD20 и CD3 гетеродимером "антитело против CD20/scFv против CD3" анализировали посредством FACS с использованием клеток Raji (с высокой экспрессией CD20) и Jurkat (с высокой экспрессией CD3). FACS проводили, как описано в Примере 8 выше. Как показано в табл. 7 и табл. 8, гетеродимерная конструкция "антитело против CD20/scFv против CD3" связывалась с клетками Raji и клетками Jurkat, что указывает на связывание этой конструкции как с антигеном CD20, так и с антигеном CD3.

Таблица 7
Связывающая активность в отношении клеток
Raji с высокой экспрессией CD20

Образец	MFI
Изотипический контроль	2,77
Гетеродимер «антитело против CD20/scFv против CD3»	7,28

Таблица 8
Связывающая активность в отношении клеток Jurkat с
высокой экспрессией CD3

Образец	MFI
Изотипический контроль	2,75
Гетеродимер «антитело против CD20/scFv против CD3»	5,61

Пример 19. Очистка гетеродимерного биспецифичного антитела "антитело против PD-L1/scFv против CD3".

Полученный культуральный супернатант очищали, как описано в примере 5 выше. Очищенный продукт анализировали посредством SDS-PAGE. Результат показан на фиг. 20. Степень чистоты гетеродимерного продукта "антитела против PD-L1/scFv против CD3" превышала 95%.

Пример 20. Связывающая активность гетеродимерного биспецифичного антитела "антитело против PD-L1/scFv против CD3" *in vitro*.

Активность связывания PD-L1 гетеродимерной конструкцией "антитело против PD-L1/scFv против CD3" анализировали посредством ELISA. ELISA проводили, как описано в Примере 13 выше. На планшет для ELISA сорбировали PD-L1 (Sino Biological, каталожный номер 10084-H08H). Как показано на фиг. 21, гетеродимер "антитело против PD-L1/scFv против CD3" обладает высокой аффинностью связывания с PD-L1.

Активность связывания CD3 гетеродимером "антитело против PD-L1/scFv против CD3" анализировали посредством FACS с использованием клеток Jurkat (с высокой экспрессией CD3). FACS проводили, как описано в примере 8 выше. Как показано в табл. 9, гетеродимер "антитело против PD-L1/scFv против CD3" связывался с клетками Jurkat, что указывает на его связывание с антигеном CD3.

Таблица 9
Связывающая активность в отношении клеток Jurkat с
высокой экспрессией CD3

Образец	MFI
Изотипический контроль	2,70
Гетеродимер «антитело против PD-L1/scFv против CD3»	8,90

Пример 21. Связывающая активность гетеродимерного биспецифичного антитела "антитело против PD-L1/scFv против CD3" в отношении PD-L1 и CD3 одновременно.

Гетеродимер "антитело против PD-L1/scFv против CD3" анализировали посредством FACS на предмет связывающей активности в отношении PD-L1 и CD3 одновременно с использованием клеток H460 и клеток Jurkat. Анализ проводили, как описано в Примере 9 выше. Как показано на фиг. 22, гетеродимерная конструкция "антитело против PD-L1/scFv против CD3" может индуцировать объединение клеток H460 (с высокой экспрессией PD-L1) с клетками Jurkat (с высокой экспрессией CD3), и это означает, что гетеродимер может привлекать Т-клетки к опухолевым клеткам и приводить к повышению активности по уничтожению раковых клеток.

Пример 22. Цитотоксичность гетеродимерного биспецифичного антитела "антитело против PD-L1/scFv против CD3" *in vitro*.

Клетки-мишени (H1650 и HCC827) собирали и ресуспендировали в полной среде RPMI 1640 (10% FBS) при плотности клеток 1×10^5 клеток/мл. Клетки-мишени H1650 и HCC827 высевали в 96-луночные планшеты в количестве 50 мкл на лунку (5×10^3 клеток на лунку), после чего вносили серийно разведенные образцы гетеродимера "антитело против PD-L1/scFv против CD3" и контрольные образцы с полной средой в количестве 100 мкл на лунку. Клетки-эффекторы (человеческие PBMC, Lonza, каталожный номер CC-2702) ресуспендировали в полной среде при плотности клеток 2×10^5 клеток/мл и затем высевали по 50 мкл в каждую лунку (1×10^5 клеток на лунку). Культуральный планшет инкубировали в течение 3 суток в CO_2 -инкубаторе при 37°C . После инкубации отбирали супернатант и клетки промывали два раза с использованием 200 мкл DPBS для удаления эффекторных клеток. В образец добавляли 100 мкл полной среды и 20 мкл MTS, после чего инкубировали в CO_2 -инкубаторе при 37°C в течение 2-3 ч. Поглощение при 490 нм (значение OD) определяли с использованием устройства для прочтения микропланшетов. Цитотоксичность рассчитывали следующим образом:

$$\text{цитотоксичность} = \frac{\text{OD}_{\text{контроль}} - \text{OD}_{\text{эксперимент}}}{\text{OD}_{\text{контроль}}}$$

Как показано на фиг. 23 (с эффекторными клетками), гетеродимерная конструкция "антитело против PD-L1/scFv против CD3" уничтожала раковые клетки с высокой экспрессией PD-L1 (клетки немелкоклеточного рака легкого H1650 и HCC827) зависимым от концентрации образом, демонстрируя высокую активность по уничтожению опухолевых клеток.

Пример 23. Очистка продуктов экспрессии антител против HER2 и против CD20 для получения биспецифичного антитела в формате Fab-Fab.

Для очистки использовали систему AKTA Explorer 100 (GE Healthcare) с колонкой для аффинной хроматографии Protein A Sepharose Fast Flow (внутренний диаметр 16 мм, 22 мл, GE Healthcare) при 4°C . Исходно колонку уравнивали с использованием буфера А (20 mM PBST; 150 mM NaCl, pH 7,4), при этом клеточный супернатант вносили после стабилизации нулевой линии со скоростью потока 5 мл/мин и затем проводили уравнивание с использованием буфера А. Образцы представляли собой продукты экспрессии антител против HER2 и против CD20 с аминокислотными мутациями в доменах CH3, экспрессированные методами, описанными в примере 4 выше. После этого проводили промывку колонки 5 объемами колонки буфера В1 (буфер А + 0,5 M Arg) и затем элюирование 5 объемами колонки буфера В2 (100 mM лимонная кислота, pH 3,0) с получением пика элюирования, представляющего собой желаемый белок. Скорость потока на стадии элюирования составляла 5 мл/мин. Типичная хроматограмма продукта антитела против CD20 показана на фиг. 24; для продукта антитела против HER2 были получены сходные результаты (не показано). Пик элюирования, показанный серым цветом, собирали и добавляли 1 M ацетат натрия для корректировки pH до 5,0.

Пример 24. Очистка гетеродимерного биспецифичного антитела "антитело против HER2/антитело против CD20" наподобие естественного IgG.

Общая структура гетеродимера "антитело против HER2/антитело против CD20" показана на фиг. 25.

Проводили повторное объединение очищенных продуктов по примеру 23 *ex vivo* с образованием гетеродимеров. Сначала проводили замену буфера на забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS) с применением концентрирования ультрафильтрацией (отсечение по молекулярной массе 10 кДа). Концентрацию каждого из продуктов антител против HER2 и против CD20 корректировали до 1 мг/мл в PBS и добавляли 1/200 объема 1 M дитиотреитола (DTT) (конечная концентрация DTT составляла 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10 или 20 mM). Затем проводили восстановление при 4°C в течение 3-8 ч. Во время этой стадии восстановления дисульфидные связи, такие как дисульфидные связи в шарнирной области гомодимеров, которые могут присутствовать в продуктах экспрессии антител против HER2 и против CD20, разрываются, что приводит к образованию полуантител (или полумеров) с одной легкой цепью и одной тяжелой цепью, как показано на фиг. 26. После стадии восстановления образец анализировали посредством SDS-PAGE в денатурирующих условиях. Типичные результаты для продукта антитела против CD20 показаны на фиг. 27; для продукта антитела против HER2 были получены сходные результаты (не показано). На фиг. 27 четыре основные полосы, присутствующие на дорожках 2-4, представляют собой, сверху вниз: гомодимер LC-HC-HC-LC, полумер HC-LC, HC и LC соответственно. Как показано на фиг. 27, при увеличении концентрации DTT остаются видны только две полосы (HC и LC) практически без гомодимеров. На фиг. 28 показаны результаты SEC-HPLC-анализа в присутствии 1 mM DTT в PBS,

полученные для полуантитела против HER2 (А) и полуантитела против CD20 (В). Как показано на фиг. 28, при концентрации DTT, равной или превышающей 1 мМ, доля гомодимеров каждого из продуктов анти-тел против HER2 и против CD20 составляла менее 10%, а доля молекул полуантител (полумеров) - более 90% по массе всех рассматриваемых полипептидных форм.

Восстановленные полумеры против HER2 и против CD20 затем смешивали 1:1 (молярное отношение) и проводили их повторное объединение при 4°C в течение 0,5-24 ч. При таком повторном объединении полумеры против HER2 и против CD20 образовывали гетеродимер "антитело против HER2/антитело против CD20", содержащий оба полумера, удерживаемые друг рядом с другом преимущественно нековалентными взаимодействиями CH₂/CH₃. Затем проводили замену буфера на PBS с применением концентрирования ультрафильтрацией (отсечение по молекулярной массе 10 кДа). Состояние восстановления прекращали посредством окисления воздухом или окислителем с образованием в гетеродимерном биспецифичном антителе межцепочечных дисульфидных связей. Условия окисления включали воздействие воздуха в течение 1 суток, 3 суток, 4 суток или добавление окислителя 100 мМ L-дегидроаскорбиновой кислоты (конечная концентрация белка составляла 1 мг/мл, а конечная концентрация окислителя - 0,5, 1, 5 или 10 мМ) при 4°C и инкубацию в течение 5 или 24 ч. После окисления продукт анализировали посредством SDS-PAGE. Результат показан на фиг. 29.

С применением концентрации ультрафильтрацией (отсечение по молекулярной массе 10 кДа) указанный выше гетеродимер "антитело против HER2/антитело против CD20", полученный восстановлением-окислением полумеров против HER2 и против CD20, концентрировали и проводили замену буфера на 10 мМ PBST, pH 5,8. Для очистки образцов использовали систему AKTA Explorer 100 (GE Healthcare) с колонкой для ионообменной хроматографии Source 15S (внутренний диаметр 16 мм, 17 мл, GE Healthcare) при 4°C. Исходно колонку уравнивали с использованием буфера А (10 мМ Na₃PO₄, pH 7,0), при этом раствор белка, обработанный как указано выше, вносили после стабилизации нулевой линии со скоростью потока 3 мл/мин и затем проводили уравнивание с использованием буфера А. После этого, используя градиент от буфера А (10 мМ Na₃PO₄, pH 7,0) до буфера В (10 мМ Na₃PO₄, pH 5,8), колонку промывали 20 объемами колонки (0% В - 100% В за 170 мин, скорость потока 2 мл/мин). Собирали основной отмеченный пик элюирования (показанный на фиг. 30). Собранный раствор белка концентрировали, еще раз заменяя буфер на PBS (pH 7,4) и используя ультрафильтрационную пробирку (отсечение по молекулярной массе 10 кДа), и стерилизовали фильтрацией при 4°C для хранения. Очищенный продукт анализировали посредством SDS-PAGE. Результат показан на фиг. 31. Продукт также анализировали посредством SEC-HPLC, результат показан на фиг. 32. Степень чистоты составила 97,3%.

Пример 25. Разработка метода анализа для определения гетеродимера "антитело против HER2/антитело против CD20".

Проводили HPLC-анализ следующих пяти образцов: полуантитело против HER2, гомодимер против HER2, полуантитело против CD20, гомодимер против CD20 и гетеродимер "антитело против HER2/антитело против CD20". Эксперимент проводился следующим образом: (1) колонка для хроматографии гидрофобного взаимодействия (TSK-GEL Phenyl-5PW, 7,5 мм (внутренний диаметр) × 7,5 см, 10 мкм); (2) подвижная фаза и градиент: буфер А: 20 мМ PBS, pH 7,0, 1 М (NH₄)₂SO₄; буфер В: 20 мМ PBS, pH 7,0; градиент от 40% буфера В до 100% буфера В за 40 мин; (3) скорость потока: 0,5 мл/мин; (4) температура: 25°C; (5) длина волны при детекции: 280 нм. Как хорошо видно по результатам, показанным на фиг. 33, данный метод позволяет эффективно различать гомодимер Fc1 против CD20 (пик 1 на фиг. 33), гомодимер Fc2 против HER2 (пик 5 на фиг. 33) и гетеродимер "антитело против HER2/антитело против CD20" (пик 3 на фиг. 33) по разному времени их удерживания. Эти результаты подтвердили, что продукт, полученный в примере 24, является гетеродимером, а не гомодимером.

Пример 26. Определение гетеродимера "антитело против HER2/антитело против CD20" по масс-спектрам.

Три следующих образца, гомодимер против HER2, гомодимер против CD20 и гетеродимер "антитело против HER2/антитело против CD20" анализировали методом LC-MS, рассчитывая долю определяемых аминокислот. Указанные выше образцы обрабатывали трипсином и инкубировали при 37°C в течение 18 ч. Условия LC-MS были следующими. Колонка: Waters ACQUITY UPLC BEH C18, 300Å, 1,7 мкм, 2,1 мм × 100 мм. Температура колонки: 50°C. Скорость потока: 0,2 мл/мин. Буфер А: 0,1%-я муравьиная кислота. Буфер В: 0,1%-я муравьиная кислота/100%-й ацетонитрил. Градиент элюирования: 2-35% буфера В за 90 мин; 35-45% буфера В за 20 мин. Источник ESI: режим положительных ионов. Напряжение на капилляре: 2,5 кВ. Напряжение на конусе: 25 В. Диапазон сканирования: 100-2500 Да. Напряжение MS^c: 20-40 В.

На фиг. 34 показана ионообменная хроматограмма основного пика (base peak ion chromatogram, BPI) гомодимера против HER2, гомодимера против CD20 и гетеродимера "антитело против HER2/антитело против CD20" (фиг. 34А), а также доля определяемых аминокислот для каждого образца (фиг. 34В). Для гомодимера против CD20 указанная доля составляла 99,7%, для гомодимера против HER2 - 100%, для гетеродимера "антитело против HER2/антитело против CD20" - 99,4%. Аминокислот-

ные последовательности легкой цепи и тяжелой цепи гомодимера против CD20, содержащие две характерные аминокислотные замены, определенные при LC-MS, показаны в SEQ ID NO: 73 и 74 соответственно. Аминокислотные последовательности легкой цепи и тяжелой цепи гомодимера против HER2, содержащие три характерные аминокислотные замены, определенные при LC-MS, показаны в SEQ ID NO: 75 и 76 соответственно. Аминокислотные последовательности легкой цепи и тяжелой цепи против CD20 гетеродимера против CD20/HER2, содержащие две характерные аминокислотные замены, определенные при LC-MS, показаны в SEQ ID NO: 77 и 78 соответственно. Аминокислотные последовательности легкой цепи и тяжелой цепи против HER2 гетеродимера против CD20/HER2, содержащие три характерные аминокислотные замены, определенные при LC-MS, показаны в SEQ ID NO: 79 и 80, соответственно. Аминокислоты глицин в положении 66 и лизин в положении 67 в SEQ ID NO: 74, аминокислоты глицин в положении 66, лизин в положении 67, лизин в положении 218, аланин в положении 343, лизин в положении 344 в SEQ ID NO: 78 и аминокислоты лизин в положении 217, аланин в положении 342, лизин в положении 343 в SEQ ID NO: 80 при LC-MS-анализе обнаружены не были. Полученные результаты показали, что гетеродимер "антитело против HER2/антитело против CD20" имел ожидаемую последовательность.

Специалистам в данной области будет ясна возможность проведения множества различных модификаций и изменений без выхода за рамки объема и сущности настоящего изобретения. Таким образом, следует понимать, что различные воплощения изобретения, описанные здесь, приведены лишь для наглядности и не ограничивают объем изобретения. Все ссылки, приведенные здесь, полностью включены сюда посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гетеродимер, содержащий элемент, связывающийся с Fc-рецептором (FcR), и одну или более чем одну распознающую группировку, ковалентно связанную с элементом, связывающимся с FcR, где указанный элемент, связывающийся с FcR, содержит первый полипептид и второй полипептид, соединенные друг с другом одной или более чем одной дисульфидной связью, каждый из которых содержит по меньшей мере часть константной области тяжелой цепи иммуноглобулина; и где указанные первый полипептид и второй полипептид содержат по меньшей мере пять аминокислотных замен в следующих положениях по нумерации Kabat EU:

- a) T366 и D399 в первом полипептиде и L351, Y407 и K409 во втором полипептиде; или
- b) T366 и K409 в первом полипептиде и L351, D399 и Y407 во втором полипептиде;

благодаря чему первый и второй полипептиды имеют более высокую склонность к димеризации друг с другом, чем сами с собой,

где пять аминокислотных замен присутствуют в двух доменах CH3 константной области тяжелой цепи иммуноглобулина как первого полипептида, так и второго полипептида и включают любой из следующих элементов группы I (a)-(h) и группы II (a)-(h):

группа I:

- a) T366L и D399R в первом полипептиде и L351E, Y407L и K409V во втором полипептиде;
- b) T366L и D399C в первом полипептиде и L351G, Y407L и K409C во втором полипептиде;
- c) T366L и D399C в первом полипептиде и L351Y, Y407A и K409P во втором полипептиде;
- d) T366P и D399N в первом полипептиде и L351V, Y407P и K409S во втором полипептиде;
- e) T366W и D399G в первом полипептиде и L351D, Y407P и K409S во втором полипептиде;
- f) T366P и D399I в первом полипептиде и L351P, Y407F и K409F во втором полипептиде;
- g) T366V и D399T в первом полипептиде и L351K, Y407T и K409Q во втором полипептиде; и
- h) T366L и D399A в первом полипептиде и L351W, Y407H и K409R во втором полипептиде,

группа II:

- a) T366L и K409V в первом полипептиде и L351E, Y407L и D399R во втором полипептиде;
- b) T366L и K409C в первом полипептиде и L351G, Y407L и D399C во втором полипептиде;
- c) T366L и K409P в первом полипептиде и L351Y, Y407A и D399C во втором полипептиде;
- d) T366P и K409S в первом полипептиде и L351V, Y407P и D399N во втором полипептиде;
- e) T366W и K409S в первом полипептиде и L351D, Y407P и D399G во втором полипептиде;
- f) T366P и K409F в первом полипептиде и L351P, Y407F и D399I во втором полипептиде;
- g) T366V и K409Q в первом полипептиде и L351K, Y407T и D399T во втором полипептиде; и
- h) T366L и K409R в первом полипептиде и L351W, Y407H и D399A во втором полипептиде,

где Fc-рецептор представляет собой Fc-рецептор, выбранный из группы, состоящей из FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB1, FcγRIIB2, FcγRIIB3, FcγRIIB4, FcεRI, FcεRII, FcαRI, Fcα/μR и FcRn,

где элемент, связывающийся с FcR, содержит Fc-домен, и Fc-домен имеет происхождение от Fc-домена IgG, который включает Fc-домен, выбранный из группы, состоящей из Fc-домена IgG1, Fc-домена IgG2, Fc-домена IgG3 и Fc-домена IgG4,

где одна или более чем одна распознающая группировка содержит по меньшей мере один из антигенсвязывающих (Fab) фрагментов, одноцепочечных вариабельных (scFv) фрагментов, внеклеточных

доменов мембранных рецепторов, пептидных лигандов клеточных мембранных рецепторов, цитокинов, факторов свертывания, аффинных меток и их комбинаций.

2. Гетеродимер по п.1, где одна или более чем одна распознающая группировка содержит две распознающие группировки, каждая из которых содержит Fab-фрагменты.

3. Гетеродимер по п.2, где два Fab-фрагмента неидентичны.

4. Гетеродимер по п.3, содержащий иммуноглобулиноподобную молекулу.

5. Гетеродимер по любому из пп.3, 4, представляющий собой биспецифичное антитело.

6. Гетеродимер по п.1, где одна или более чем одна распознающая группировка содержит две распознающие группировки, содержащие Fab-фрагмент и scFv-фрагмент.

7. Гетеродимер по любому из пп.1-6, где в физиологических условиях в водном растворе, содержащем 1 мМ дитиотреитола, в гомодимерной форме существует менее чем 50% по массе каждого из первого и второго полипептидов и когнатной распознающей группировки указанного первого или второго полипептида, исходя из массы всех полипептидных форм в растворе, при условии, что указанный раствор по существу свободен от полипептидов, отличных от указанных первого или второго полипептида и его когнатной распознающей группировки.

8. Гетеродимер по любому из пп.1-7, где по меньшей мере пять аминокислотных замен включают T366L и D399R в первом полипептиде и L351E, Y407L и K409V во втором полипептиде.

9. Гетеродимер по п.3, содержащий первую тяжелую цепь и вторую тяжелую цепь, первую легкую цепь и вторую легкую цепь, где первая тяжелая цепь и вторая тяжелая цепь неидентичны и где первая легкая цепь и вторая легкая цепь неидентичны.

10. Гетеродимер по п.6, где Fab-фрагмент и scFv-фрагмент выбраны из пары распознающих группировок, выбранных из группы III (a)-(d):

группа III:

a) Fab, специфично связывающийся с HER2, и scFv, специфично связывающийся с CD3;

b) Fab, специфично связывающийся с Троп-2, и scFv, специфично связывающийся с CD3;

c) Fab, специфично связывающийся с CD20, и scFv, специфично связывающийся с CD3; и

d) Fab, специфично связывающийся с PD-L1, и scFv, специфично связывающийся с CD3.

11. Гетеродимер по п.3, где два неидентичных Fab-фрагмента включают первый Fab-фрагмент, специфично связывающийся с HER2, и второй Fab-фрагмент, специфично связывающийся с CD20.

12. Гетеродимер по любому из пп.1-11, где по меньшей мере один из первого полипептида и второго полипептида включает аминокислотные последовательности, показанные в SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 или 30, и другой полипептид включает аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 или 31.

13. Гетеродимер по любому из пп.1-12, где элемент, связывающийся с FcR, способен связываться с Fc-рецептором, выбранным из группы, состоящей из FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB1, FcγRIIB2, FcγRIIA, FcγRIIB, FcεRI, FcεRII, FcαRI, Fcα/μRI и FcRn.

14. Гетеродимер по п.13, где элемент, связывающийся с FcR, способен связываться с FcRn.

15. Гетеродимер по п.13, где связывание с Fc-рецептором запускает ADCC (антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность).

16. Способ получения гетеродимера по любому из пп. 1-15, включающий:

1) экспрессию одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей первый полипептид, как он определен в п.1, в первой клетке-хозяине, и одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей второй полипептид, как он определен в п.1, во второй клетке-хозяине, где первая клетка-хозяин и вторая клетка-хозяин отделены друг от друга;

2) восстановление первого полипептида, как он определен в п.1, и второго полипептида, как он определен в п.1, когда они разделены;

3) объединение первого полипептида, как он определен в п.1, и второго полипептида, как он определен в п.1, с получением смеси;

4) окисление полученной смеси; и

5) выделение образованного гетеродимера.

17. Способ получения гетеродимера по п.1, содержащего бивалентный гетерологичный иммуноглобулин, имеющий первую тяжелую цепь, вторую тяжелую цепь, первую легкую цепь и вторую легкую цепь, где первая тяжелая цепь и вторая тяжелая цепь неидентичны, где первая легкая цепь и вторая легкая цепь неидентичны, где часть первой тяжелой цепи и второй тяжелой цепи образуют Fc-область бивалентного гетерологичного иммуноглобулина, включающий

1) экспрессию одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, в первой клетке-хозяине и одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, во второй клетке-хозяине, где первая клетка-хозяин и вторая клетка-хозяин отделены друг от друга;

2) восстановление первой тяжелой цепи и первой легкой цепи совместно и второй тяжелой цепи и второй легкой цепи совместно;

3) объединение первой тяжелой цепи, первой легкой цепи, второй тяжелой цепи и второй легкой цепи с получением смеси;

4) окисление полученной смеси; и

5) выделение образованного гетеродимера;

где Fc-область содержит по меньшей мере пять аминокислотных замен, включающих любой из следующих элементов группы IV (a)-(h):

группа IV:

a) T366L и D399R в первой тяжелой цепи и L351E, Y407L и K409V во второй тяжелой цепи;

b) T366L и D399C в первой тяжелой цепи и L351G, Y407L и K409C во второй тяжелой цепи;

c) T366L и D399S в первой тяжелой цепи и L351Y, Y407A и K409P во второй тяжелой цепи;

d) T366P и D399N в первой тяжелой цепи и L351V, Y407P и K409S во второй тяжелой цепи;

e) T366W и D399G в первом полипептиде и L351D, Y407P и K409S во второй тяжелой цепи;

f) T366P и D399I в первом полипептиде и L351P, Y407F и K409F во второй тяжелой цепи;

g) T366V и D399T в первой тяжелой цепи и L351K, Y407T и K409Q во второй тяжелой цепи; и

h) T366L и D399A в первой тяжелой цепи и L351W, Y407H и K409R во второй тяжелой цепи.

18. Способ получения гетеродимера по п.1, содержащего бивалентный гетерологичный иммуноглобулин, имеющий первую тяжелую цепь, вторую тяжелую цепь, первую легкую цепь и вторую легкую цепь, где первая тяжелая цепь и вторая тяжелая цепь неидентичны, где первая легкая цепь и вторая легкая цепь неидентичны, где часть первой тяжелой цепи и второй тяжелой цепи образуют Fc-область бивалентного гетерологичного иммуноглобулина, включающий

1) экспрессию одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, в первой клетке-хозяине и одной или более чем одной нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, во второй клетке-хозяине, где первая клетка-хозяин и вторая клетка-хозяин отделены друг от друга;

2) восстановление первой тяжелой цепи и первой легкой цепи совместно и второй тяжелой цепи и второй легкой цепи совместно;

3) объединение первой тяжелой цепи, первой легкой цепи, второй тяжелой цепи и второй легкой цепи с получением смеси;

4) окисление полученной смеси; и

5) выделение образованного гетеродимера;

где Fc-область содержит по меньшей мере пять аминокислотных замен, включающих любой из следующих элементов группы V (a)-(h):

группа V:

a) T366L и K409V в первой тяжелой цепи и L351E, Y407L и D399R во второй тяжелой цепи;

b) T366L и K409C в первой тяжелой цепи и L351G, Y407L и D399C во второй тяжелой цепи;

c) T366L и K409P в первой тяжелой цепи и L351Y, Y407A и D399S во второй тяжелой цепи;

d) T366P и K409S в первой тяжелой цепи и L351V, Y407P и D399N во второй тяжелой цепи;

e) T366W и K409S в первой тяжелой цепи и L351D, Y407P и D399G во второй тяжелой цепи;

f) T366P и K409F в первой тяжелой цепи и L351P, Y407F и D399I во второй тяжелой цепи;

g) T366V и K409Q в первой тяжелой цепи и L351K, Y407T и D399T во второй тяжелой цепи; и

h) T366L и K409R в первой тяжелой цепи и L351W, Y407H и D399A во второй тяжелой цепи.

19. Способ по любому из пп.16-18, где одна или более чем одна нуклеиновая кислота содержится в векторе.

20. Способ по п.19, где вектор включает плазмидные векторы pX0GC, полученные модификацией векторов pCDNA.

21. Способ по п.20, где вектор вводят в клетку или клетки.

22. Способ по п.21, где клетка или клетки включают одну из клеток HEK293, HEK293T, HEK293F или CHO, CHO-S, CHO-dhfr⁻, CHO/DG44 и ExpiCHO.

23. Способ по любому из пп.16-18, где стадия восстановления включает

1) добавление восстановителя, содержащего одно из 2-аминоэтантола, дитиотреитола (DTT), трис(2-карбоксиэтил)фосфина, их производных и их комбинаций;

2) восстановление на протяжении по меньшей мере приблизительно 3 ч при приблизительно 4°C;

3) удаление восстановителя.

24. Способ по п.23, где восстановитель содержит DTT в концентрации приблизительно 0,1 mM или выше.

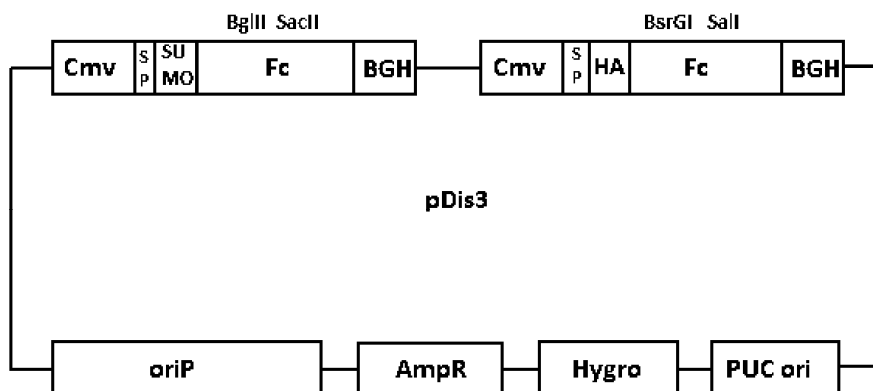
25. Способ по любому из пп.23, 24, где восстановитель удаляют с использованием колонки для обессоливания.

26. Способ по любому из пп.16-18 и 23-25, где стадия окисления включает окисление воздухом на протяжении по меньшей мере приблизительно 5 ч.

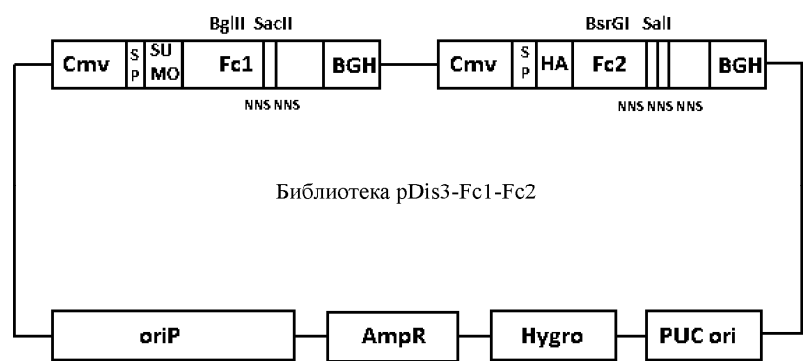
27. Способ по любому из пп.16-18 и 23-25, где стадия окисления включает

1) добавление окислителя, содержащего L-дегидроаскорбиновую кислоту, ее производные или их комбинации;

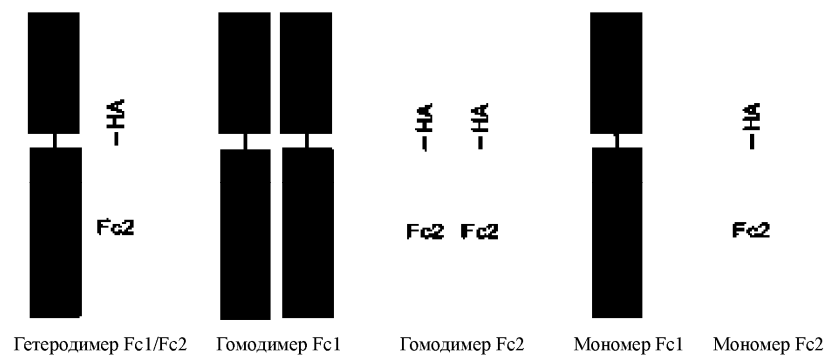
- 2) окисление на протяжении по меньшей мере приблизительно 5 ч при приблизительно 4°C; и
3) удаление окислителя.
28. Способ по п.27, где окислитель содержит L-дегидроаскорбиновую кислоту в концентрации приблизительно 0,5 мМ или выше.
29. Способ по любому из пп.16-26, дополнительно включающий стадию разделения.
30. Нуклеиновая кислота, кодирующая по меньшей мере один из первого полипептида и второго полипептида, как они определены в любом из пп.1-15.
31. Нуклеиновая кислота п.30, содержащая по меньшей мере одну из SEQ ID NO: 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 47, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62 и 64-67.
32. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп.30, 31.
33. Вектор по п.32, включающий плазмидные векторы pX0GC, полученные модификацией векторов pCDNA.
34. Клетка-хозяин, содержащая вектор по любому из пп.32, 33.
35. Клетка-хозяин по п.34, включающая одну из клеток HEK293, HEK293T, HEK293F или CHO, CHO-S, CHO-dhfr⁻, CHO/DG44 и ExpiCHO.
36. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель; и одно из
1) гетеродимера по любому из пп.1-15;
2) нуклеиновой кислоты по любому из пп.30, 31;
3) вектора по любому из пп.32, 33; и
4) клетки-хозяина по любому из пп.34, 35.
37. Способ лечения или предотвращения заболевания или расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту фармацевтической композиции по п.36, содержащей гетеродимер по любому из пп.1-15.
38. Способ по п.37, где заболевание или расстройство включает одно или более из аутоиммунных заболеваний, иммунного ответа против трансплантатов, аллергических реакций, инфекций, нейродегенеративных заболеваний, опухолевых заболеваний и клеточных пролиферативных расстройств, артрита, ревматоидного артрита, псориаза, рассеянного склероза (РС), язвенного колита, болезни Крона, системной красной волчанки (СКВ), гломерулонефрита, заболеваний наподобие дилатационной кардиомиопатии, синдрома Шегрена, аллергического контактного дерматита, полимиозита, склеродермии, узелкового периартериита, ревматизма, витилиго, инсулинозависимого сахарного диабета, синдрома Бехчета, хронического тиреоидита, болезни Паркинсона, болезни Гентингтона, болезни Мачадо-Джозефа, бокового амиотрофического склероза (БАС), болезни Крейтцфельдта-Якоба, лейкоза, лимфомы, миеломы, опухолей головного мозга, плоскоклеточного рака головы и шеи, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака носоглотки, рака пищевода, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака печени, колоректального рака, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака эндометрия, саркомы матки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, почечноклеточного рака, меланомы и их комбинаций.
39. Способ по любому из пп.37, 38, где субъект представляет собой человека.



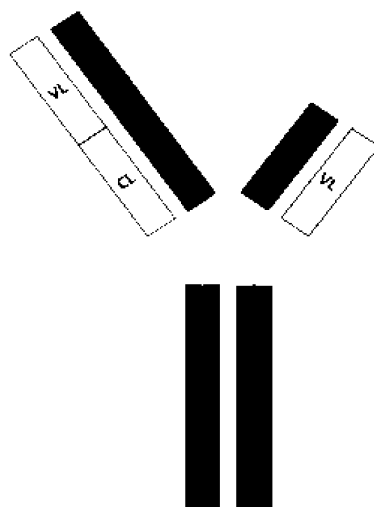
Фиг. 1



Фиг. 2

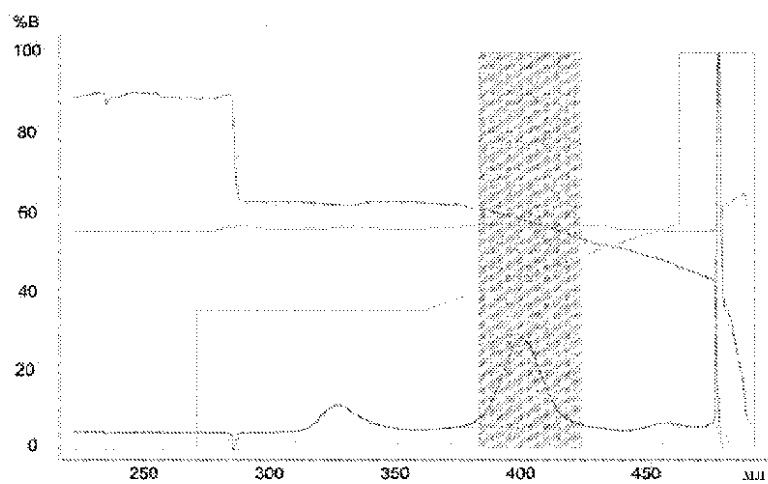


Фиг. 3

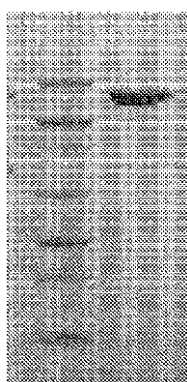


Фиг. 4

042601



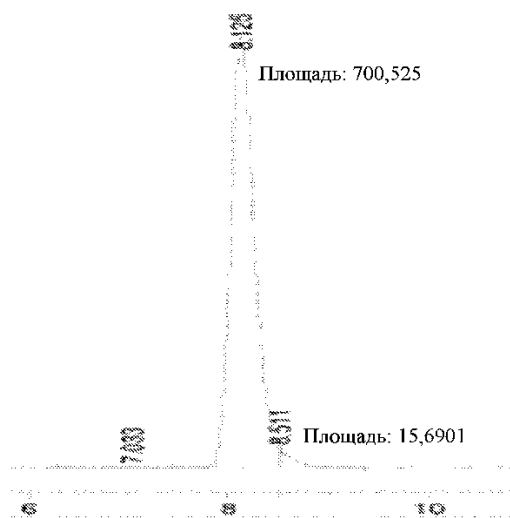
Фиг. 5



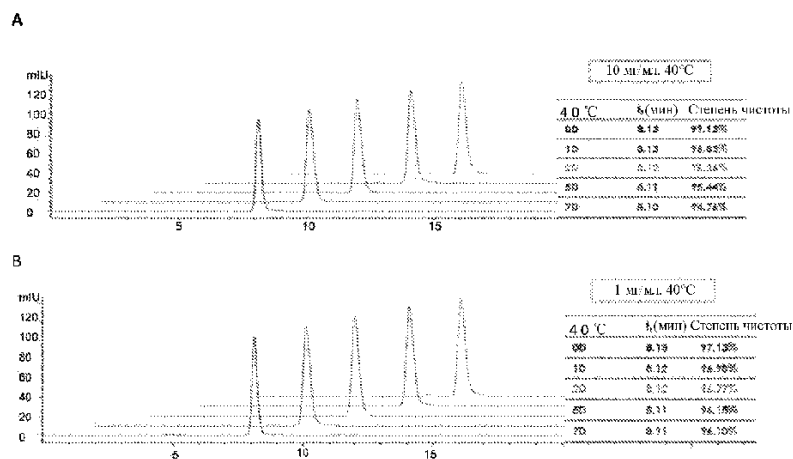
1. Стандарт молекулярной массы
2. Очищенное гетеродимерное антитело

1 2

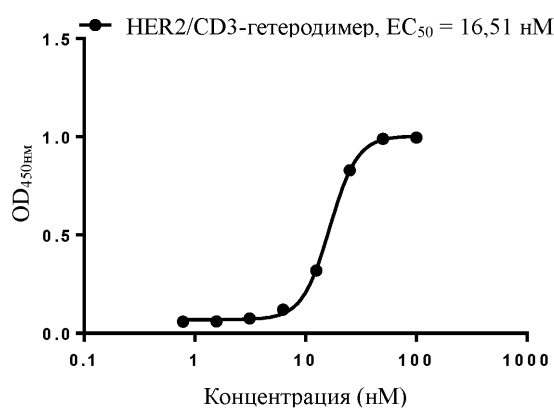
Фиг. 6



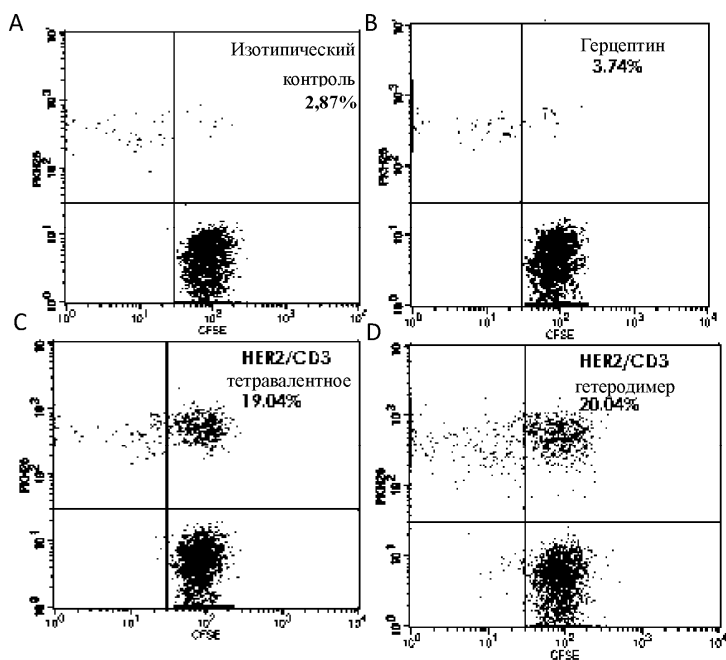
Фиг. 7



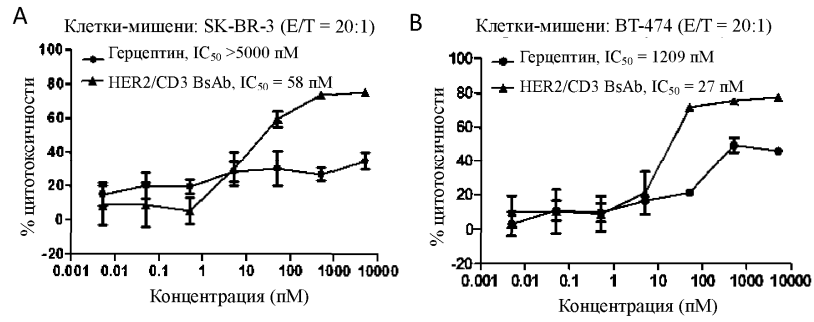
Фиг. 8



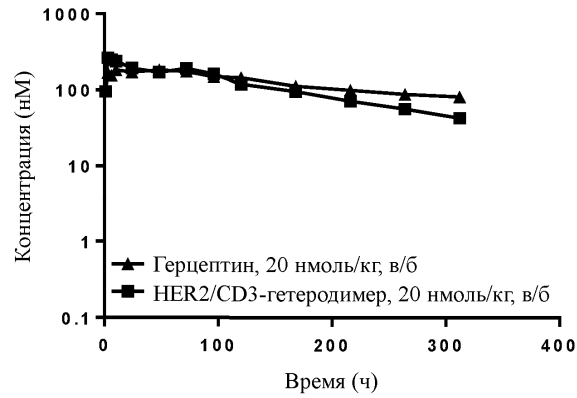
Фиг. 9



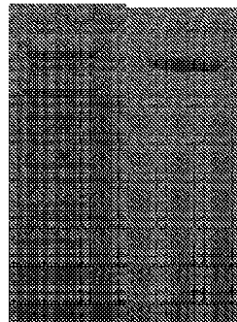
Фиг. 10



Фиг. 11



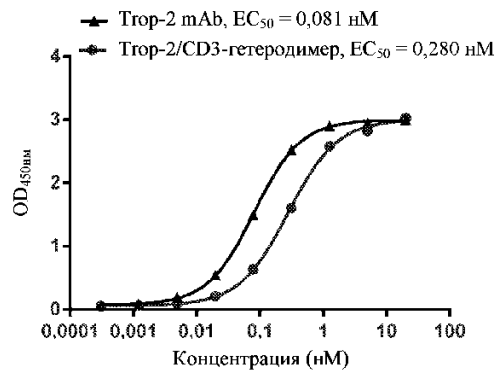
Фиг. 12



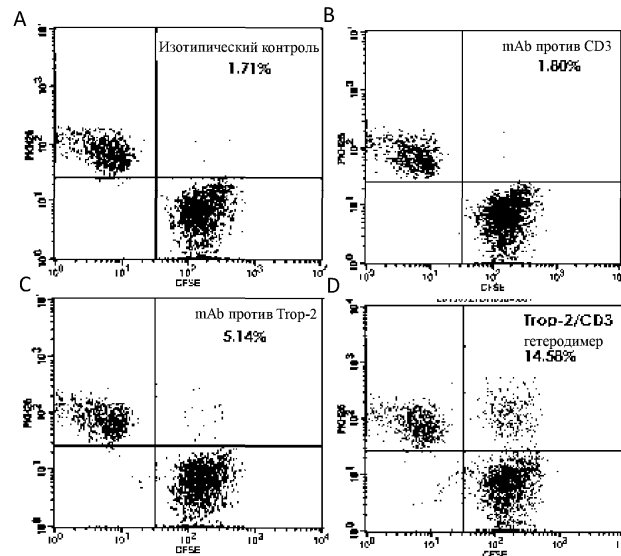
1 2

1. Стандарт молекулярной массы
2. Очищенное гетеродимерное антитело

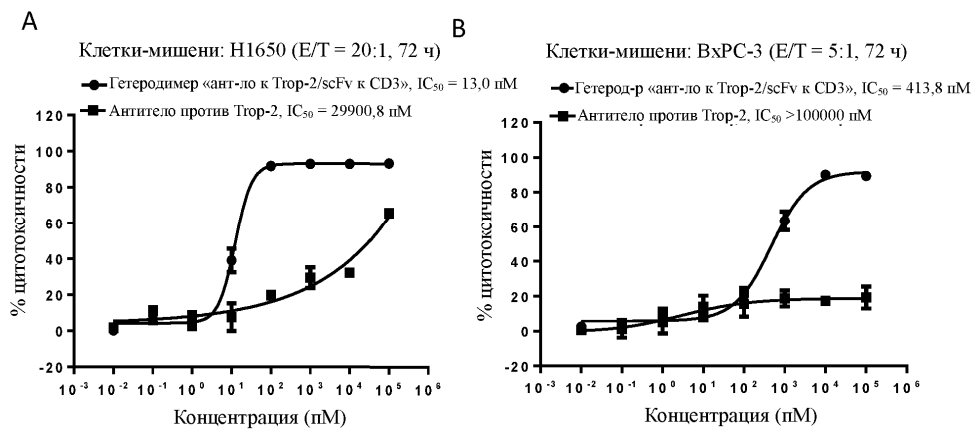
Фиг. 13



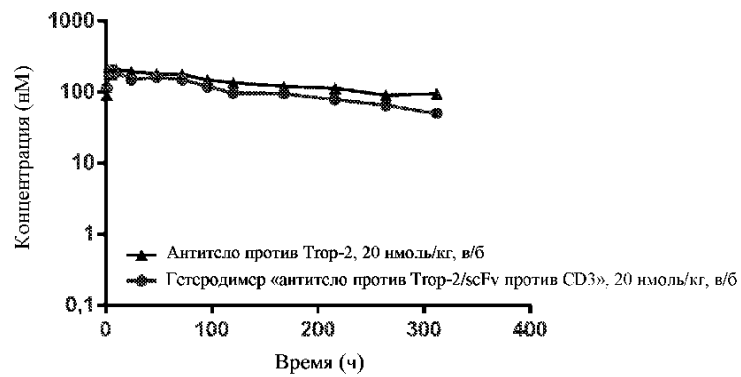
Фиг. 14



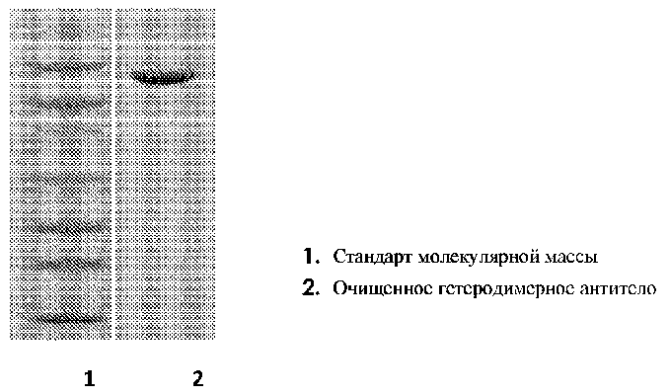
Фиг. 15



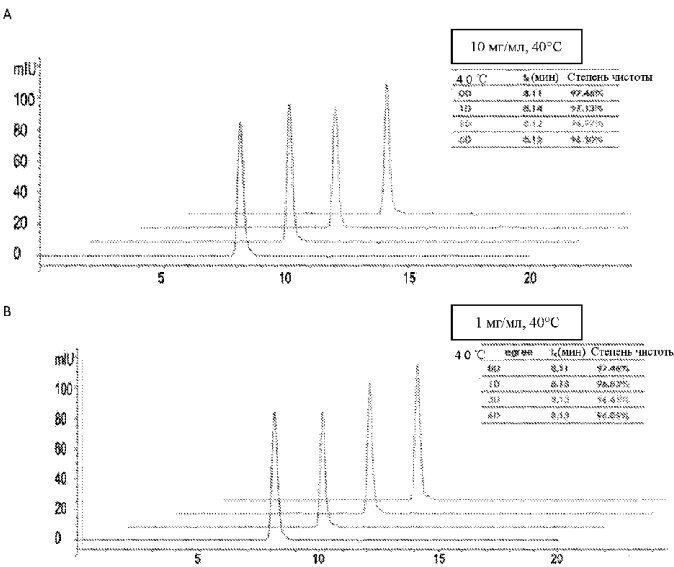
Фиг. 16



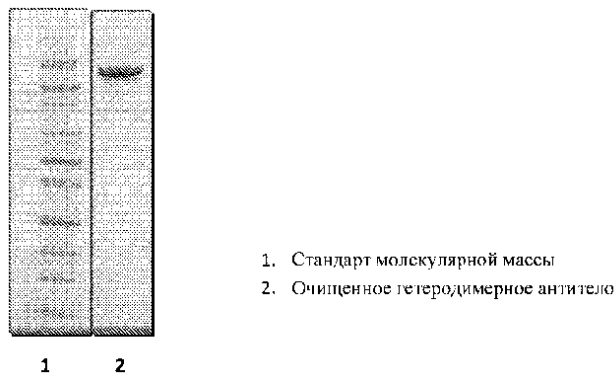
Фиг. 17



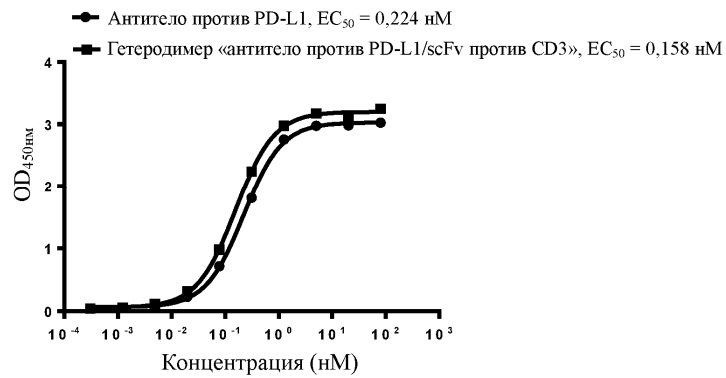
Фиг. 18



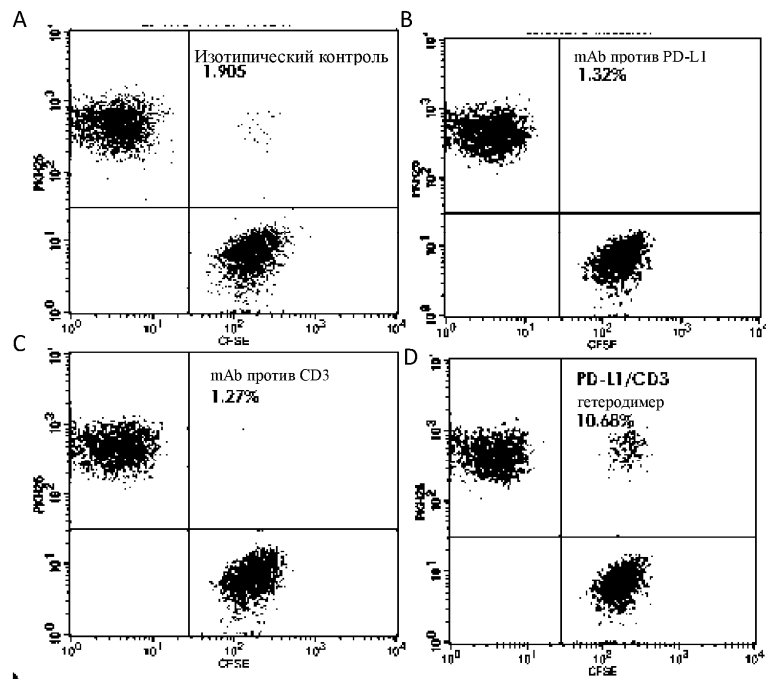
Фиг. 19



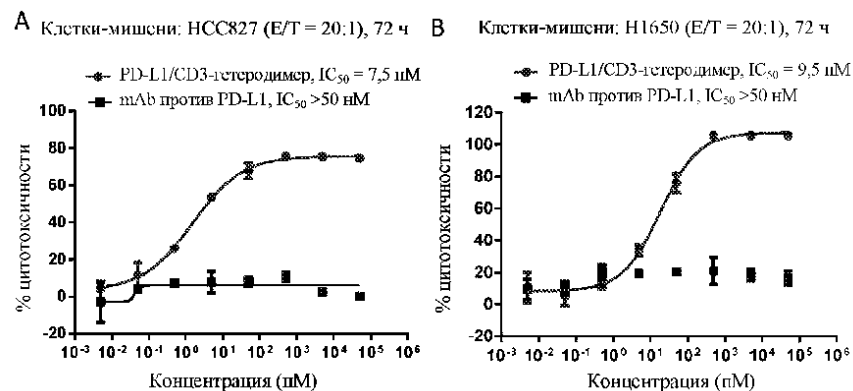
Фиг. 20



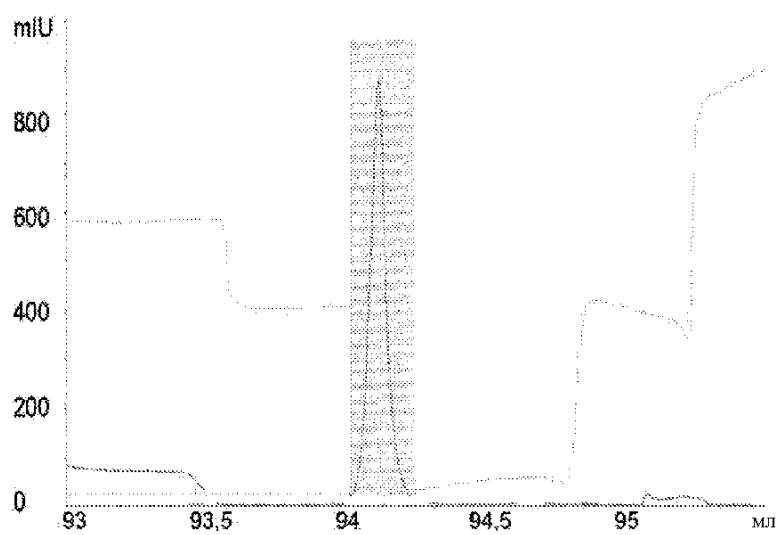
Фиг. 21



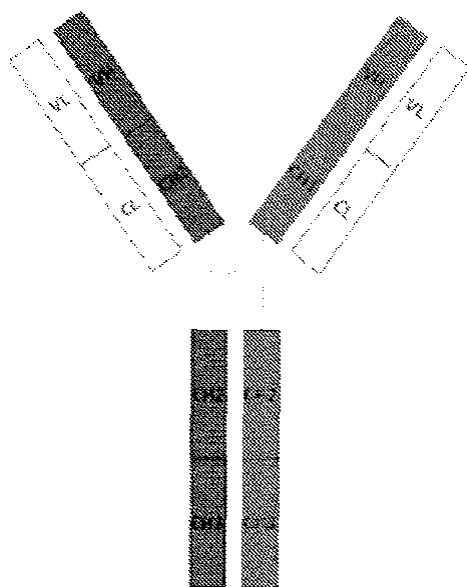
Фиг. 22



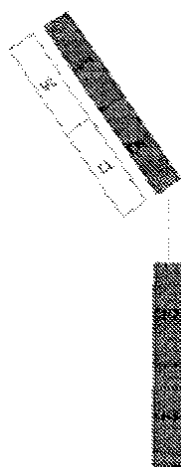
Фиг. 23



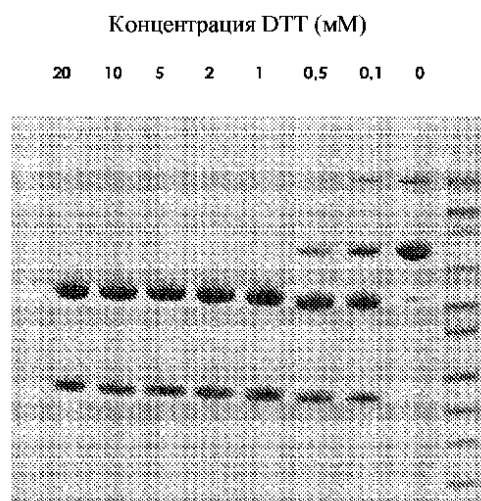
Фиг. 24



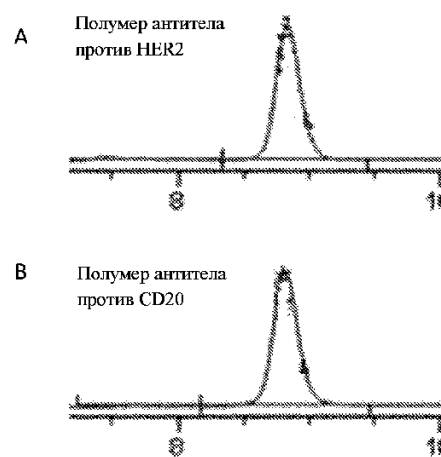
Фиг. 25



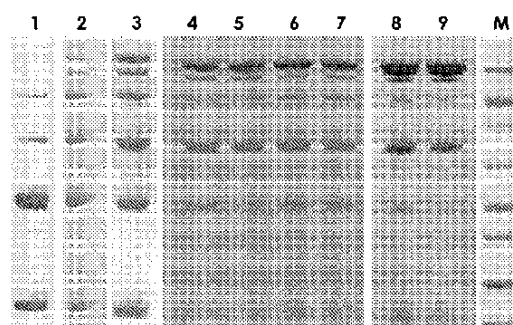
Фиг. 26



Фиг. 27

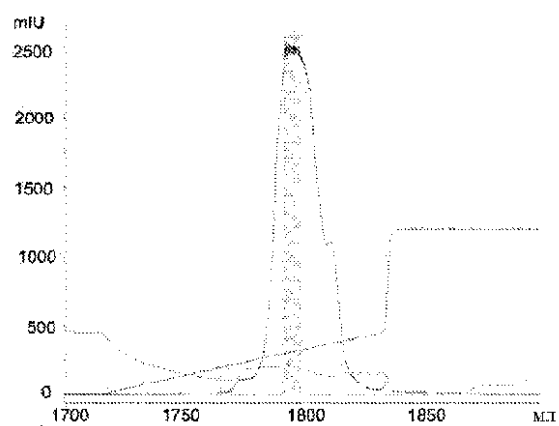


Фиг. 28

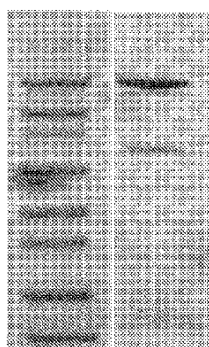


1. Воздух, 1 сутки
2. Воздух, 3 сутки
3. Воздух, 5 сутки
4. (L)-дНАА, 0,5 мМ
5. (L)-дНАА, 1 мМ
6. (L)-дНАА, 5 мМ
7. (L)-дНАА, 10 мМ
8. (L)-дНАА, 5 мМ, 5 ч
9. (L)-дНАА, 5 мМ, 24 ч

Фиг. 29



Фиг. 30

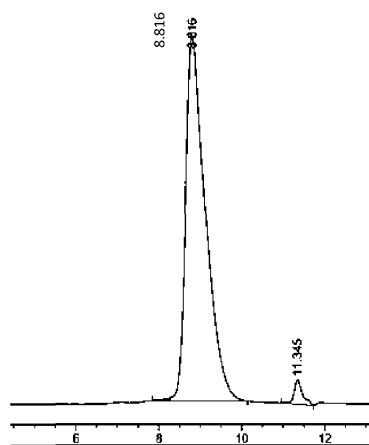


1. Стандарт молекулярной массы
2. Очищенное гетеродимерное антитело

1

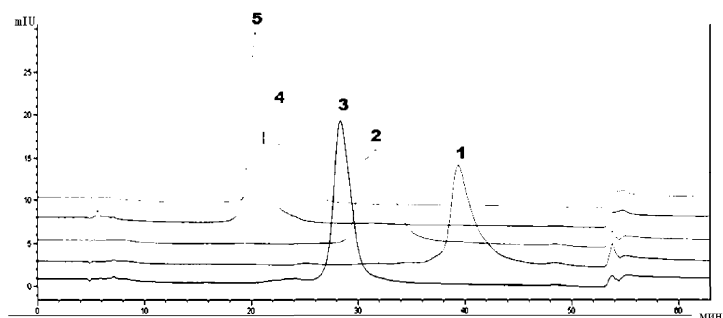
2

Фиг. 31

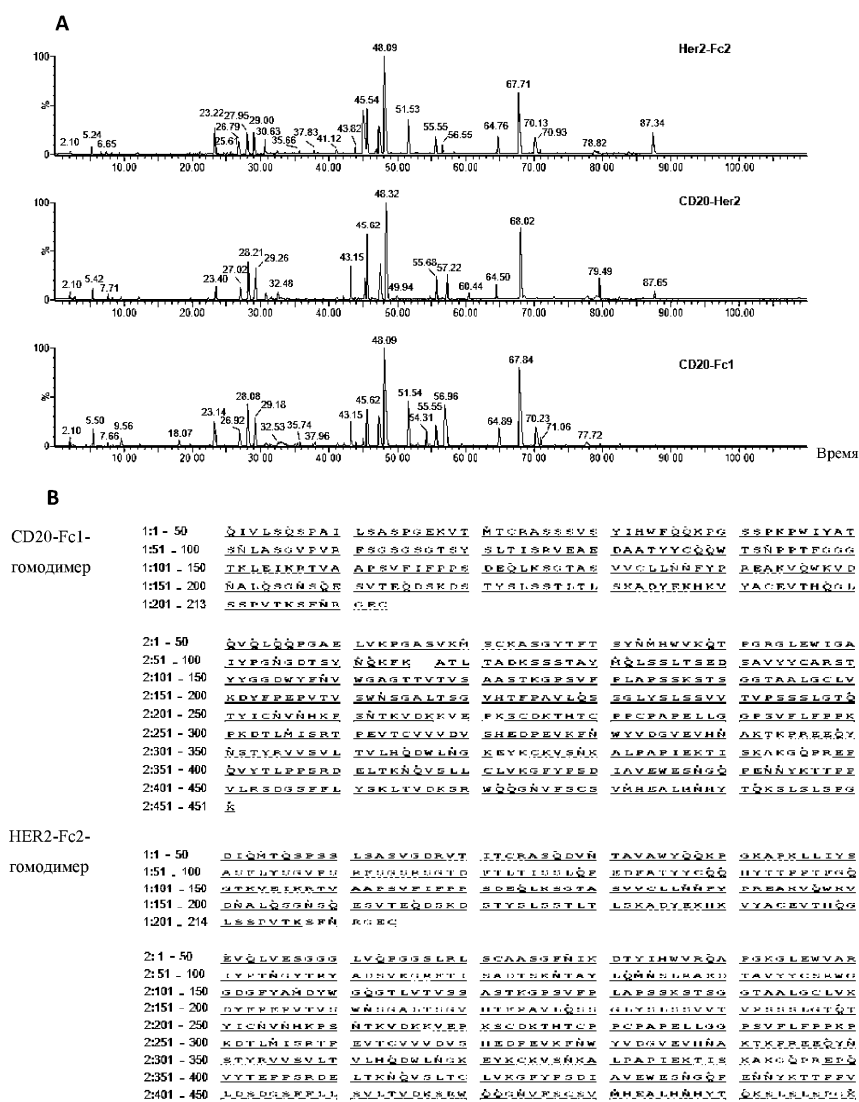


Фиг. 32

1. CD20-Fc1, гомодимер
2. CD20-Fc1, мономер
3. CD20-Fc1+Her2-Fc2, образец после обратного окисления
4. Мономер Her2-Fc2
5. Гомодимер Her2-Fc2



Фиг. 33



CD20-HER2- гетеродимер	1:1 - 50	<u>QIVLQSQSPA</u>	<u>LSASFGREKVT</u>	<u>MTCRASSSVS</u>	<u>YINWFPQQKEQ</u>	<u>SSPKFWIYAT</u>
	1:51 - 100	<u>SHLASGVFVB</u>	<u>ESGSGSGTSY</u>	<u>SLTISRVEAE</u>	<u>DAATYYCQW</u>	<u>TSNPFTFGG</u>
	1:101 - 150	<u>TKLEIKFTVA</u>	<u>APSVFIFFPS</u>	<u>DEQLKSSGAS</u>	<u>VVCLLNHFY</u>	<u>REAKVQWQVD</u>
	1:151 - 200	<u>NALQSGNSQ</u>	<u>SVTEQDSKDS</u>	<u>TVLSSTLT</u>	<u>SKADYKHKV</u>	<u>YACEVTHQSL</u>
	1:201 - 213	<u>SSPVTKSFN</u>	<u>REC</u>			
	2:1 - 50	<u>QVQLQSPGAE</u>	<u>LVKFGASVKM</u>	<u>SKASGYTPT</u>	<u>SYNMHWVKQT</u>	<u>PSKLEWIGA</u>
	2:51 - 100	<u>IYFGNGDTSY</u>	<u>NQKFK</u>	<u>ATL</u>	<u>TADKSSSTAY</u>	<u>MQLSLSLTSED</u>
	2:101 - 150	<u>YYCGDWYFN</u>	<u>WGAGTTVT</u>	<u>AASTKGFSVF</u>	<u>FLAPSSKSTS</u>	<u>GGTAALGCLV</u>
	2:151 - 200	<u>KQYFFEPVTV</u>	<u>SWNSGALTS</u>	<u>VHTFFAVLQS</u>	<u>SLYSLSSV</u>	<u>TVFSSSLGTQ</u>
	2:201 - 250	<u>TYICNVNHR</u>	<u>NTKVDK</u>	<u>VE</u>	<u>PKSGDKTHTC</u>	<u>PPCPAPELLG</u>
	2:251 - 300	<u>EKDTLHISRT</u>	<u>EVTCVYVDV</u>	<u>SHEDPEVKFN</u>	<u>WYVDGVEVHN</u>	<u>AKTKFRSEQY</u>
	2:301 - 350	<u>NSTYRVVSV</u>	<u>TVLHQDWLNG</u>	<u>KYKCKVSNK</u>	<u>ALPAPTEKTI</u>	<u>SK</u>
	2:351 - 400	<u>QVYTLPPSRD</u>	<u>ELTKHQVSLT</u>	<u>CLVKGFYPSD</u>	<u>IAVEWESNGQ</u>	<u>ENNNYKTTTP</u>
	2:401 - 450	<u>VLRSDGSFFL</u>	<u>YKLTVDKSP</u>	<u>WQSGNVFSGS</u>	<u>VMHEALHNHY</u>	<u>TQKSLSLSPG</u>
	2:451 - 451	<u>K</u>				
	1:1 - 50	<u>QVQLTQSPFS</u>	<u>LSASVGDFT</u>	<u>ITCRASQDVN</u>	<u>TAVAWYQQR</u>	<u>ENAKKLLIYE</u>
	1:51 - 100	<u>ASFLYSQVTS</u>	<u>DFSGTASSTQ</u>	<u>FTLTISLSLT</u>	<u>EDFATYYCQW</u>	<u>MYTTFPTFGQ</u>
	1:101 - 150	<u>STKLVKAKTV</u>	<u>AAENVVIFPK</u>	<u>DEQLKSSGAS</u>	<u>VVCLLNHFY</u>	<u>REAKVQWQVD</u>
	1:151 - 200	<u>DNALQSGNSQ</u>	<u>SVTEQDSKDS</u>	<u>TVLSSTLT</u>	<u>SKADYKHKV</u>	<u>YACEVTHQSL</u>
	1:201 - 214	<u>SSPVTKSFN</u>	<u>REC</u>			
	2:1 - 50	<u>EVQLVRSQGG</u>	<u>LVQPGQSIRI</u>	<u>SCAASQFNIE</u>	<u>DTYINHWVRQA</u>	<u>PSKLEWVAR</u>
	2:51 - 100	<u>IYFTNVYJAY</u>	<u>APVYKAKFTI</u>	<u>SAITGKNTAY</u>	<u>MQNNLHAPD</u>	<u>TAVYYGQWQW</u>
	2:101 - 150	<u>SGGFYAMQYW</u>	<u>SGDTLYTVSS</u>	<u>ASTKGSFVFP</u>	<u>FLAPSSKSTS</u>	<u>GGTAALGCLV</u>
	2:151 - 200	<u>DYFDEPVTVS</u>	<u>WNSGALTSQV</u>	<u>HTFFAVLQSS</u>	<u>SLYSLSSV</u>	<u>TVFSSSLGTQ</u>
	2:201 - 250	<u>YICNVNHR</u>	<u>NTKVDK</u>	<u>VE</u>	<u>PKSGDKTHTC</u>	<u>PPCPAPELLG</u>
	2:251 - 300	<u>KDTLHISRT</u>	<u>EVTCVYVDV</u>	<u>SHEDPEVKFN</u>	<u>WYVDGVEVHN</u>	<u>AKTKFRSEQY</u>
	2:301 - 350	<u>STYRVVSVLT</u>	<u>TVLHQDWLNG</u>	<u>KYKCKVSNK</u>	<u>ALPAPTEKTI</u>	<u>SK</u>
	2:351 - 400	<u>VYTERPSRDS</u>	<u>ELTKHQVSLT</u>	<u>CLVKGFYPSD</u>	<u>IAVEWESNGQ</u>	<u>ENNNYKTTTP</u>
	2:401 - 450	<u>VLRSDGSFFL</u>	<u>YKLTVDKSP</u>	<u>WQSGNVFSGS</u>	<u>VMHEALHNHY</u>	<u>TQKSLSLSPG</u>

Фиг. 34

