

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202292414** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2023.01.25

(51) Int. Cl. *C07K 16/06* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2021.03.18

---

(54) **МУЛЬТИСПЕЦИФИЧНЫЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ И СПОСОБЫ ИХ РАЗРАБОТКИ**

---

(31) 62/994,509

(72) Изобретатель:

(32) 2020.03.25

**Чай Цин, У Сюфэн (US)**

(33) US

(74) Представитель:

(86) PCT/US2021/022935

**Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина Е.М.,**

(87) WO 2021/194839 2021.09.30

**Угрюмов В.М., Джермакян Р.В.,**

(71) Заявитель:

**Строкова О.В., Христофоров А.А.**

**ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)**

**(RU)**

---

(57) Мультиспецифичные связывающие белки, которые связывают первый антиген и второй антиген, а также способы очистки мультиспецифичных связывающих белков.

**202292414**  
**A1**

**202292414**

**A1**

## МУЛЬТИСПЕЦИФИЧНЫЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ И СПОСОБЫ ИХ РАЗРАБОТКИ

Настоящее изобретение относится к области медицины, в частности, к области  
5 мультиспецифичных связывающих белков, таких как биспецифичные антитела и  
триспецифичные связывающие белки, применяемых при лечении заболеваний, и способам  
разработки указанных белков.

Мультиспецифичные связывающие белки представляют собой полипептиды,  
которые содержат несколько различных антигенсвязывающих доменов. Множество  
10 форматов мультиспецифичных связывающих белков, таких как те, которые изложены в  
WO2001077342, WO2007110205, WO2008024188, WO2009089004, WO2012135345 и  
WO2016118742, раскрыто и даже протестировано для лечения различных аутоиммунных  
заболеваний, разных видов рака, инфекционных заболеваний и сердечно-сосудистого  
заболевания. Несмотря на то, что мультиспецифичные связывающие белки обеспечивают  
15 возможность повышения терапевтической пользы, например, за счет нацеливания на  
несколько антигенов, возможность экономии средств и повышения удобства для  
пациентов, их разработка в качестве терапевтических кандидатов ограничена.

Фактором, ограничивающим продвижение мультиспецифичных связывающих  
белков, является сложность сборки, изготовления и очистки этих молекул. Например,  
20 изготовление биспецифичных молекул требует не только правильной сборки  
различающихся антигенсвязывающих доменов, но и сборки различающихся  
антигенсвязывающих доменов в единую молекулу. Во время рекомбинантной экспрессии  
мультиспецифичного связывающего белка часто экспрессируется смесь, включающая  
нецелевые молекулы (например, моноспецифичные белки, одноцепочечные пары и т.д.).  
25 Целевой мультиспецифичный связывающий белок должен быть очищен не только от  
экспрессионной среды, но и от смеси нецелевых молекул. Образование нецелевых  
молекул и необходимость дополнительных этапов очистки приводят к снижению выхода  
целевого мультиспецифичного связывающего белка и увеличению общих затрат на  
изготовление.

Попытки улучшить разработку и очистку мультиспецифичных связывающих  
30 белков раскрыты, например, как изложено в WO20100151792, WO2013088259 и  
WO2013136186. Однако эти раскрытия оказались ограниченными в решении проблем  
разработки мультиспецифичных связывающих белков. Например, в некоторых случаях  
эти раскрытия демонстрируют одно или более из нарушенной эффекторной функции,  
35 проблем повышенной иммуногенности, измененной сборки, измененной аффинности

и/или сниженных фармакокинетических свойств, таких как период полувыведения. В некоторых случаях применимость раскрытия ограничена конкретной молекулой и/или форматом. Таким образом, остается потребность в улучшенных мультиспецифичных связывающих белках и способах разработки указанных белков, которые улучшают разработку мультиспецифичных связывающих белков без изменения стабильности или аффинности и не сопровождаются неприемлемой иммуногенностью.

Соответственно, настоящее изобретение направлено на удовлетворение одной или более из вышеуказанных потребностей путем обеспечения улучшенных мультиспецифичных связывающих белков и способов разработки указанных белков.

10 Варианты реализации мультиспецифичных связывающих белков и способов согласно настоящему изобретению обеспечивают улучшенную очистку целевого мультиспецифичного связывающего белка, сохранение и/или улучшение сборки молекулы, снижение агрегации белка, улучшенную физическую стабильность и не сопровождаются повышенным риском иммуногенности, изменением эффекторной

15 функции и/или изменением фармакокинетических свойств. Кроме того, варианты реализации настоящего изобретения сохраняют аффинность мультиспецифичного связывающего белка и снижают или устраняют нежелательное связывание легкой каппа-цепи с реагентом для очистки. Кроме того, варианты реализации настоящего изобретения не увеличивают время и/или стоимость способа очистки или способа разработки в целом.

20 Соответственно, согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения предложен мультиспецифичный связывающий белок, который связывает первый антиген и второй антиген. В соответствии с некоторыми вариантами реализации предложены мультиспецифичные связывающие белки, которые связывают первый антиген и второй антиген, причем указанный мультиспецифичный связывающий белок

25 содержит первый антигенсвязывающий домен, содержащий первую область Fab легкой цепи и первую область Fab тяжелой цепи, при этом указанная первая область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь и содержит: лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС); лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС), лизин в аминокислотном остатке

30 199 (нумерация ЕС) и аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС); лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС), лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС) и аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС); лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС), лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС), аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и

35 аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС); аспарагиновую

кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС); аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС), лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС) и аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС); аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС); аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС), лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС) и аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС); аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС); аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС); или аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС); и второй антигенсвязывающий домен, содержащий вторую область Fab легкой цепи и вторую область Fab тяжелой цепи, при этом указанный первый антигенсвязывающий домен связывает первый антиген, и указанный второй антигенсвязывающий домен связывает второй антиген. В соответствии с некоторыми такими вариантами реализации, если первая область Fab легкой цепи содержит лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС), то вторая область Fab легкой цепи не содержит лизина в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС) и лизина в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС); если первая область Fab легкой цепи содержит лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС), лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС) и аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС), то вторая область Fab легкой цепи не содержит лизина в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС), лизина в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС) и аланина в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС); если первая область Fab легкой цепи содержит лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС), лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС) и аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС), то вторая область Fab легкой цепи не содержит лизина в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС), лизина в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС) и аспарагиновой кислоты в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС); если первая область Fab легкой цепи содержит лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС), лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС), аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС), то вторая область Fab легкой цепи не содержит лизина в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС), лизина в

аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС), аланина в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС); если первая область Fab легкой цепи содержит аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС), то вторая область Fab легкой цепи не содержит аспарагиновой кислоты в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС) и лизина в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС); если первая область Fab легкой цепи содержит аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС), лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС) и аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС), то вторая область Fab легкой цепи не содержит аспарагиновой кислоты в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС), лизина в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС) и аланина в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС); если первая область Fab легкой цепи содержит аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС), то вторая область Fab легкой цепи не содержит аспарагиновой кислоты в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС) и лизина в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС); если первая область Fab легкой цепи содержит аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС), лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС) и аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС), то вторая область Fab легкой цепи не содержит аспарагиновой кислоты в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС), лизина в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС) и аланина в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС); если первая область Fab легкой цепи содержит аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС), то вторая область Fab легкой цепи не содержит аланина в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и лизина в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС); если первая область Fab легкой цепи содержит аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС), то вторая область Fab легкой цепи не содержит аланина в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и лизина в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС); и если первая область Fab легкой цепи содержит аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС), то вторая область Fab легкой цепи не содержит аланина в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и аспарагиновой кислоты в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации мультиспецифичный связывающий белок содержит первый антигенсвязывающий домен, содержащий первую область Fab легкой цепи и первую область Fab тяжелой цепи, причем указанная первая

область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь и содержит лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС); и второй антигенсвязывающий домен, содержащий вторую область Fab легкой цепи и вторую область Fab тяжелой цепи, при этом указанный первый антигенсвязывающий домен связывает первый антиген, и указанный второй антигенсвязывающий домен связывает второй антиген. Согласно некоторым вариантам реализации первая область Fab легкой цепи дополнительно содержит аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС). Согласно некоторым вариантам реализации первая область Fab легкой цепи дополнительно содержит аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС).

В соответствии с дополнительными вариантами реализации мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению указанный мультиспецифичный связывающий белок содержит первый антигенсвязывающий домен, содержащий первую область Fab легкой цепи и первую область Fab тяжелой цепи, причем указанная первая область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь и содержит аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС); и второй антигенсвязывающий домен, содержащий вторую область Fab легкой цепи и вторую область Fab тяжелой цепи, причем указанный первый антигенсвязывающий домен связывает первый антиген, и указанный второй антигенсвязывающий домен связывает второй антиген. Согласно некоторым вариантам реализации первая область Fab легкой цепи дополнительно содержит аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС).

В соответствии с вариантами реализации мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению указанный мультиспецифичный связывающий белок содержит первый антигенсвязывающий домен, содержащий первую область Fab легкой цепи и первую область Fab тяжелой цепи, причем указанная первая область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь и содержит аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС); и второй антигенсвязывающий домен, содержащий вторую область Fab легкой цепи и вторую область Fab тяжелой цепи, при этом указанный первый антигенсвязывающий домен связывает первый антиген, и указанный второй антигенсвязывающий домен связывает второй антиген. Согласно некоторым вариантам реализации первая область Fab легкой цепи дополнительно содержит аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС).

В соответствии с вариантами реализации мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению указанный мультиспецифичный связывающий белок содержит первый антигенсвязывающий домен, содержащий первую область Fab легкой цепи и первую область Fab тяжелой цепи, причем указанная первая область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь и содержит аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС); и второй антигенсвязывающий домен, содержащий вторую область Fab легкой цепи и вторую область Fab тяжелой цепи, при этом указанный первый антигенсвязывающий домен связывает первый антиген, и указанный второй антигенсвязывающий домен связывает второй антиген.

В соответствии с вариантами реализации мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению указанный мультиспецифичный связывающий белок содержит первый антигенсвязывающий домен, содержащий первую область Fab легкой цепи и первую область Fab тяжелой цепи, причем указанная первая область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь и содержит аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС); и второй антигенсвязывающий домен, содержащий вторую область Fab легкой цепи и вторую область Fab тяжелой цепи, при этом указанный первый антигенсвязывающий домен связывает первый антиген, и указанный второй антигенсвязывающий домен связывает второй антиген.

В соответствии с другими дополнительными вариантами реализации мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению указанный мультиспецифичный связывающий белок содержит первый антигенсвязывающий домен, содержащий первую область Fab легкой цепи и первую область Fab тяжелой цепи, причем указанная первая область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь и содержит аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС); и второй антигенсвязывающий домен, содержащий вторую область Fab легкой цепи и вторую область Fab тяжелой цепи, при этом указанный первый антигенсвязывающий домен связывает первый антиген, и указанный второй антигенсвязывающий домен связывает второй антиген.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению первый антигенсвязывающий домен мультиспецифичного связывающего белка дополнительно содержит первую область Fc тяжелой цепи. Согласно другим дополнительным вариантам реализации мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению первая

область Fc тяжелой цепи содержит константную область IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Согласно некоторым вариантам реализации мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению второй антигенсвязывающий домен дополнительно содержит вторую область Fc тяжелой цепи. Согласно другим

5 дополнительным вариантам реализации мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению вторая область Fc тяжелой цепи содержит константную область IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Согласно некоторым вариантам реализации мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению первая область Fc тяжелой цепи содержит аргинин в

10 аминокислотном остатке 311 (нумерация ЕС) и глутаминовую кислоту в аминокислотном остатке 317 (нумерация ЕС). В соответствии с некоторыми вариантами реализации мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению вторая область Fc тяжелой цепи содержит аргинин в аминокислотном остатке 311 (нумерация ЕС) и глутаминовую кислоту в аминокислотном остатке 317 (нумерация ЕС). Согласно

15 некоторым вариантам реализации мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению как первая, так и вторая области Fc тяжелой цепи содержат константную область IgG1 человека; обе указанные области содержат константную область IgG2 человека; или обе указанные области содержат константную область IgG4 человека. Согласно другим дополнительным вариантам реализации мультиспецифичных

20 связывающих белков согласно настоящему изобретению как первая, так и вторая области Fc тяжелой цепи содержат аргинин в аминокислотном остатке 311 (нумерация ЕС) и глутаминовую кислоту в аминокислотном остатке 317 (нумерация ЕС). В соответствии с некоторыми вариантами реализации мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению вторая область Fab легкой цепи не содержит аланина в

25 аминокислотном остатке 109; не содержит аспарагиновой кислоты в аминокислотном остатке 110; не содержит лизина в аминокислотном остатке 143; или не содержит лизина в аминокислотном остатке 199. Согласно некоторым вариантам реализации мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению вторая область Fab легкой цепи не содержит аланина в аминокислотном остатке 109; не

30 содержит аспарагиновой кислоты в аминокислотном остатке 110; не содержит лизина в аминокислотном остатке 143; и не содержит лизина в аминокислотном остатке 199. В соответствии с некоторыми вариантами реализации мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению вторая область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь. Кроме того, в соответствии с некоторыми вариантами

реализации мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению вторая область Fab легкой цепи представляет собой легкую лямбда-цепь.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации мультиспецифичный связывающий белок содержит биспецифичный связывающий белок. В соответствии с некоторыми такими вариантами реализации биспецифичный связывающий белок представляет собой гетерологичное моноклональное антитело (гетеро-МАТ) на основе иммуноглобулина. Согласно некоторым более конкретным вариантам реализации гетеро-МАТ на основе иммуноглобулина представляет собой гетеро-МАТ IgG. В соответствии с другими дополнительными вариантами реализации мультиспецифичный связывающий белок содержит мультиспецифичный связывающий белок.

Кроме того, согласно вариантам реализации настоящего изобретения также предложены фармацевтические композиции, содержащие мультиспецифичный связывающий белок согласно настоящему изобретению и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ.

В соответствии с дополнительными вариантами реализации настоящего изобретения предложены способы очистки мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению. В соответствии с некоторыми такими вариантами реализации способ включает введение в первый антигенсвязывающий домен первой области Fab легкой цепи, содержащей лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС), причем указанная первая область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь; экспрессию мультиспецифичного связывающего белка, при этом указанный первый антигенсвязывающий домен соединяется с указанным вторым антигенсвязывающим доменом; обработку мультиспецифичного связывающего белка на колонке для аффинной хроматографии; и выделение очищенного мультиспецифичного связывающего белка. В соответствии с некоторыми такими вариантами реализации этап введения дополнительно включает введение в первый антигенсвязывающий домен аланина в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС). Согласно некоторым вариантам реализации этап введения дополнительно включает введение в первый антигенсвязывающий домен аспарагиновой кислоты в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС).

Предложены дополнительные варианты реализации способов очистки мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению, которые включают введение в первый антигенсвязывающий домен первой области Fab легкой цепи, содержащей аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС), причем указанная первая

область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь; экспрессию мультиспецифичного связывающего белка, при этом указанный первый антигенсвязывающий домен соединяется с указанным вторым антигенсвязывающим доменом; обработку мультиспецифичного связывающего белка на колонке для аффинной хроматографии; и выделение очищенного мультиспецифичного связывающего белка. В соответствии с некоторыми вариантами реализации этап введения дополнительно включает введение в первый антигенсвязывающий домен аланина в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС).

Предложены дополнительные варианты реализации способов очистки мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению, которые включают введение в первый антигенсвязывающий домен первой области Fab легкой цепи, содержащей аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС), причем указанная первая область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь; экспрессию мультиспецифичного связывающего белка, при этом указанный первый антигенсвязывающий домен соединяется с указанным вторым антигенсвязывающим доменом; обработку мультиспецифичного связывающего белка на колонке для аффинной хроматографии; и выделение очищенного мультиспецифичного связывающего белка. В соответствии с некоторыми вариантами реализации этап введения дополнительно включает введение в первый антигенсвязывающий домен аланина в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС).

В соответствии с дополнительными вариантами реализации предложены способы очистки мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению, включающие введение в первый антигенсвязывающий домен первой области Fab легкой цепи, содержащей аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС), причем указанная первая область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь; экспрессию мультиспецифичного связывающего белка, при этом указанный первый антигенсвязывающий домен соединяется с указанным вторым антигенсвязывающим доменом; обработку мультиспецифичного связывающего белка на колонке для аффинной хроматографии; и выделение очищенного мультиспецифичного связывающего белка.

Предложены дополнительные варианты реализации способов очистки мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению, включающие введение в первый антигенсвязывающий домен первой области Fab легкой цепи, содержащей аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и лизин в

аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС), причем указанная первая область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь; экспрессию мультиспецифичного связывающего белка, при этом указанный первый антигенсвязывающий домен соединяется с указанным вторым антигенсвязывающим доменом; обработку мультиспецифичного связывающего белка на колонке для аффинной хроматографии; и выделение очищенного мультиспецифичного связывающего белка.

Предложены другие дополнительные варианты реализации способов очистки мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению, включающие введение в первый антигенсвязывающий домен первой области Fab легкой цепи, содержащей аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС), причем указанная первая область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь; экспрессию мультиспецифичного связывающего белка, при этом указанный первый антигенсвязывающий домен соединяется с указанным вторым антигенсвязывающим доменом; обработку мультиспецифичного связывающего белка на колонке для аффинной хроматографии; и выделение очищенного мультиспецифичного связывающего белка.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации способов очистки мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению этап введения дополнительно включает введение в первый антигенсвязывающий домен первой области Fc тяжелой цепи. Согласно другим дополнительным вариантам реализации способов согласно настоящему изобретению первая область Fc тяжелой цепи содержит константную область IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Согласно некоторым вариантам реализации способов согласно настоящему изобретению этап введения дополнительно включает введение во второй антигенсвязывающий домен второй области Fc тяжелой цепи. Согласно другим дополнительным вариантам реализации способов согласно настоящему изобретению вторая область Fc тяжелой цепи содержит константную область IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. В соответствии с некоторыми вариантами реализации способов согласно настоящему изобретению этап введения дополнительно включает введение в первую область Fc тяжелой цепи аргинина в аминокислотном остатке 311 (нумерация ЕС) и глутаминовой кислоты в аминокислотном остатке 317 (нумерация ЕС). Согласно некоторым вариантам реализации способов согласно настоящему изобретению этап введения дополнительно включает введение во вторую область Fc тяжелой цепи аргинина в аминокислотном остатке 311 (нумерация ЕС) и глутаминовой кислоты в аминокислотном остатке 317 (нумерация ЕС). В соответствии с некоторыми вариантами реализации способов

согласно настоящему изобретению как первая область Fc тяжелой цепи, так и вторая область Fc тяжелой цепи содержат константную область IgG1 человека; обе указанные области содержат константную область IgG2 человека; или обе указанные области содержат константную область IgG4 человека. Согласно некоторым вариантам реализации способов согласно настоящему изобретению этап введения дополнительно включает введение как в первую область Fc тяжелой цепи, так и во вторую область Fc тяжелой цепи аргинина в аминокислотных остатках 311 (нумерация ЕС) и глутаминовой кислоты в аминокислотных остатках 317 (нумерация ЕС). Согласно некоторым вариантам реализации способов согласно настоящему изобретению вторая область Fab легкой цепи не содержит аланина в аминокислотном остатке 109; не содержит аспарагиновой кислоты в аминокислотном остатке 110; не содержит лизина в аминокислотном остатке 143; или не содержит лизина в аминокислотном остатке 199. Согласно некоторым вариантам реализации способов согласно настоящему изобретению вторая область Fab легкой цепи не содержит аланина в аминокислотном остатке 109; не содержит аспарагиновой кислоты в аминокислотном остатке 110; не содержит лизина в аминокислотном остатке 143; и не содержит лизина в аминокислотном остатке 199. Согласно некоторым вариантам реализации способов согласно настоящему изобретению вторая область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь. Согласно дополнительным вариантам реализации способов согласно настоящему изобретению вторая область Fab легкой цепи представляет собой легкую лямбда-цепь.

В соответствии с дополнительными вариантами реализации способов согласно настоящему изобретению колонка для аффинной хроматографии содержит аффинный лиганд для каппа-цепи. Согласно некоторым вариантам реализации способов согласно настоящему изобретению колонка для аффинной хроматографии содержит аффинный лиганд для лямбда-цепи. В соответствии с некоторыми вариантами реализации способов согласно настоящему изобретению колонка для аффинной хроматографии содержит белок А. Согласно некоторым вариантам реализации способов согласно настоящему изобретению вторая область Fab легкой цепи связывается с колонкой для аффинной хроматографии с большей аффинностью, чем первая область Fab легкой цепи. Согласно другим дополнительным вариантам реализации способов согласно настоящему изобретению первая область Fab легкой цепи не связывается с колонкой для аффинной хроматографии.

В соответствии с другими дополнительными вариантами реализации способов очистки мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению указанные способы дополнительно включают обработку очищенного

мультиспецифичного связывающего белка на второй колонке для аффинной хроматографии после этапа выделения очищенного мультиспецифичного связывающего белка; и выделение очищенного мультиспецифичного связывающего белка после этапа обработки очищенного мультиспецифичного связывающего белка на второй колонке для аффинной хроматографии. В соответствии с некоторыми вариантами реализации вторая колонка для аффинной хроматографии содержит аффинный лиганд для каппа-цепи. Согласно некоторым вариантам реализации вторая колонка для аффинной хроматографии содержит аффинный лиганд для лямбда-цепи. В соответствии с некоторыми вариантами реализации вторая колонка для аффинной хроматографии содержит белок А. Согласно некоторым другим дополнительным вариантам реализации вторая область Fab легкой цепи связывается со второй колонкой для аффинной хроматографии с большей аффинностью, чем первая область Fab легкой цепи. Кроме того, согласно некоторым вариантам реализации первая область Fab легкой цепи не связывается со второй колонкой для аффинной хроматографии.

В соответствии с другими дополнительными вариантами реализации настоящего изобретения предложен способ получения мультиспецифичного связывающего белка согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым таким вариантам реализации такие способы включают мультиспецифичный связывающий белок согласно настоящему изобретению, полученный в соответствии с некоторым способом, причем указанный способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей полинуклеотидную последовательность, при этом указанная полинуклеотидная последовательность кодирует первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен согласно настоящему изобретению, в условиях, при которых экспрессируется мультиспецифичный связывающий белок, и выделение мультиспецифичного связывающего белка согласно настоящему изобретению из указанной клетки-хозяина. В соответствии с некоторыми вариантами реализации полинуклеотидная последовательность содержит один вектор, кодирующий первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен. В соответствии с дополнительными вариантами реализации полинуклеотидная последовательность содержит первый вектор, кодирующий первый антигенсвязывающий домен, и второй вектор, содержащий второй антигенсвязывающий домен. Согласно некоторым вариантам реализации способ согласно настоящему изобретению дополнительно включает этапы обработки выделенного мультиспецифичного связывающего белка на колонке для аффинной хроматографии и выделение очищенного мультиспецифичного связывающего белка. Согласно некоторым вариантам реализации колонка для аффинной хроматографии

содержит белок А. Согласно некоторым вариантам реализации колонка для аффинной хроматографии содержит аффинный лиганд для каппа-цепи. Согласно некоторым вариантам реализации колонка для аффинной хроматографии содержит аффинный лиганд для лямбда-цепи. В соответствии с некоторыми вариантами реализации первый антигенсвязывающий домен содержит первую область Fab легкой цепи, и второй антигенсвязывающий домен содержит вторую область Fab легкой цепи, причем указанная вторая область Fab легкой цепи связывается с колонкой для аффинной хроматографии с большей аффинностью, чем указанная первая область Fab легкой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации первая область Fab легкой цепи не связывается с колонкой для аффинной хроматографии. В соответствии с другими дополнительными вариантами реализации способ согласно настоящему изобретению дополнительно включает этапы обработки очищенного мультиспецифичного связывающего белка на второй колонке для аффинной хроматографии после этапа выделения очищенного мультиспецифичного связывающего белка и выделение очищенного мультиспецифичного связывающего белка после этапа обработки очищенного мультиспецифичного связывающего белка на второй колонке для аффинной хроматографии. Согласно некоторым вариантам реализации вторая колонка для аффинной хроматографии содержит белок А. Согласно некоторым вариантам реализации вторая колонка для аффинной хроматографии содержит аффинный лиганд для каппа-цепи. Согласно некоторым вариантам реализации вторая колонка для аффинной хроматографии содержит аффинный лиганд для лямбда-цепи. В соответствии с некоторыми вариантами реализации первый антигенсвязывающий домен содержит первую область Fab легкой цепи, и второй антигенсвязывающий домен содержит вторую область Fab легкой цепи, причем указанная вторая область Fab легкой цепи связывается со второй колонкой для аффинной хроматографии с большей аффинностью, чем указанная первая область Fab легкой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации первая область Fab легкой цепи не связывается со второй колонкой для аффинной хроматографии.

Согласно другим дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения предложены мультиспецифичные связывающие белки для применения в терапии. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены мультиспецифичные связывающие белки для применения при лечении медицинского состояния. Согласно некоторым таким вариантам реализации медицинское состояние

представляет собой одно из рака, сердечно-сосудистого заболевания, аутоиммунного заболевания или нейродегенеративного заболевания.

Согласно другим дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения предложены мультиспецифичные связывающие белки для применения в изготовлении лекарственного средства. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены мультиспецифичные связывающие белки для применения в изготовлении лекарственного средства для терапии. Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения предложены мультиспецифичные связывающие белки для применения в изготовлении лекарственного средства для лечения медицинского состояния. Согласно некоторым таким вариантам реализации медицинское состояние представляет собой одно из рака, сердечно-сосудистого заболевания, аутоиммунного заболевания или нейродегенеративного заболевания.

Термин «мультиспецифичный связывающий белок» в контексте настоящего документа относится к молекуле, имеющей два или более различных антигенсвязывающих доменов. Мультиспецифичные связывающие белки согласно настоящему изобретению связывают два или более разных антигенов или два или более разных эпитопов одного и того же антигена. Варианты реализации мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению включают биспецифичные антитела, а также триспецифичные или тетраспецифичные связывающие молекулы, известные в данной области, а также одноцепочечные мультиспецифичные связывающие молекулы, включая диатела. Мультиспецифичные связывающие белки согласно настоящему изобретению могут различаться по размеру и геометрии и могут включать множество форматов, известных в данной области техники.

Как упоминается в настоящем документе, «антигенсвязывающий домен» относится к части мультиспецифичного связывающего белка, которая содержит аминокислотные остатки, которые взаимодействуют с соответствующим антигеном и придают специфичность в отношении указанного антигена. Антигенсвязывающие домены мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению включают область Fab легкой цепи и область Fab тяжелой цепи. Области Fab как тяжелой, так и легкой цепи включают переменную часть на амино-конце, содержащую CDR, перемежающиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями. Области Fab как тяжелой, так и легкой цепи также включают консервативную область (например, C<sub>L</sub> для легкой цепи и C<sub>H1</sub> для области Fab тяжелой цепи, как известно в данной области). Области Fab легкой цепи классифицируются как каппа или лямбда, как известно в данной области техники.

Некоторые варианты реализации мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению включают области Fc тяжелой цепи, связанные на карбокси-конце области Fab тяжелой цепи (например, образующие тяжелую цепь, как известно в данной области). Области Fc тяжелой цепи согласно настоящему изобретению классифицируются как гамма и определяют изотип тяжелой цепи как IgG и один из подклассов IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Область Fc тяжелой цепи может дополнительно соответствовать эффекторной функции (известной в данной области) мультиспецифичного связывающего белка.

В соответствии с некоторыми конкретными вариантами реализации мультиспецифичные связывающие белки согласно настоящему изобретению содержат молекулу гетеро-MAT IgG или ее фрагмент. Как известно в данной области техники, молекулы гетеро-MAT IgG содержат архетипичную архитектуру Fab и структуру IgG (с одним «плечом» Fab или антигенсвязывающим доменом, связывающим первый антиген, и другим «плечом» Fab или антигенсвязывающим доменом, связывающим второй антиген).

Термин «нумерация ЕС», признанный в данной области техники, относится к системе нумерации аминокислотных остатков молекул иммуноглобулинов. Нумерация ЕС описана, например, в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991); Edelman, G.M, et al., *Proc. Natl. Acad. USA*, 63, 78-85 (1969); и [http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu\\_IGHGnber.html#refs](http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html#refs). Термин «нумерация по Kabat» признан в данной области техники как относящийся к системе нумерации аминокислотных остатков, которые являются более вариабельными (т.е. гипервариабельными), чем другие аминокислотные остатки в вариабельных областях тяжелой и легкой цепей (см., например, Kabat, et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-93 (1971); Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)). Термин «нумерация по North» относится к системе нумерации аминокислотных остатков, которые являются более вариабельными (т.е. гипервариабельными), чем другие аминокислотные остатки в вариабельных областях тяжелой и легкой цепей, она основана, по меньшей мере частично, на кластеризации распределения аффинности с большим числом кристаллических структур, как описано в (North et al., *A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations*, *Journal of Molecular Biology*, 406:228-256 (2011)).

В настоящем документе термин «аффинная хроматография» относится к хроматографическому методу разделения биохимических смесей (например, мультиспецифичного связывающего белка и нецелевых соединений биомолекул),

основанному на специфичных обратимых взаимодействиях между биомолекулами. Примерные варианты реализации аффинной хроматографии включают аффинные колонки с белком А, хроматографию с аффинным лигандом для каппа-цепи (такую как CaptureSelect™, КappaXL™, КappaSelect™, КappaXP™) или хроматографию с аффинным лигандом для лямбда-цепи.

«Исходная» или «родительская» молекула, упоминаемая в настоящем документе, представляет собой молекулу, кодируемую аминокислотной последовательностью, которая используется при получении одного из примерных вариантов реализации, изложенных в настоящем документе, например, путем аминокислотных замен и структурного изменения. Исходная молекула может содержать, например, мышинное антитело или его фрагмент, или связывающий белок, полученный посредством фагового дисплея или трансгенных животных, отличных от человека, например.

Мультиспецифичный связывающий белок согласно настоящему изобретению может быть включен в фармацевтическую композицию, которая может быть приготовлена способами, хорошо известными в данной области техники, и содержит мультиспецифичный связывающий белок согласно настоящему изобретению, и один или более фармацевтически приемлемых носителей и/или разбавителей (например, Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 22<sup>nd</sup> Edition, Loyd V., Ed., Pharmaceutical Press, 2012, в котором представлен сборник методик приготовления, общеизвестных практикующим специалистам). Подходящие носители для фармацевтических композиций включают любой материал, который в сочетании с мультиспецифичным связывающим белком сохраняет активность молекулы и не вступает в реакцию с иммунной системой пациента.

Векторы экспрессии, способные управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны, хорошо известны в данной области техники. Векторы экспрессии могут кодировать сигнальный пептид, который облегчает секрецию полипептида(ов) из клетки-хозяина. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид. Каждый из экспрессируемых полипептидов может экспрессироваться независимо с разных промоторов, с которыми функционально связаны указанные полипептиды, в одном векторе или, альтернативно, может экспрессироваться независимо с разных промоторов, с которыми функционально связаны указанные полипептиды, в нескольких векторах. Векторы экспрессии, как правило, реплицируются в организмах-хозяевах либо как эписомы, либо как неотъемлемая часть хромосомной ДНК хозяина. Обычно векторы экспрессии будут содержать селективные маркеры, например, тетрациклин, неомицин и дигидрофолатредуктазу,

чтобы обеспечить возможность детектирования тех клеток, которые трансформированы целевыми последовательностями ДНК.

Клетка-хозяин относится к клеткам, стабильно или временно трансфицированным, трансформированным, трансдуцированным или инфицированным одним или более векторами экспрессии, экспрессирующими одну или более полипептидных цепей мультиспецифичного связывающего белка согласно настоящему изобретению. Создание и выделение линий клеток-хозяев, продуцирующих связывающие белки согласно настоящему изобретению, можно осуществлять, используя стандартные методики, известные в данной области техники. Клетки млекопитающих являются предпочтительными клетками-хозяевами для экспрессии мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению. Конкретные клетки млекопитающих включают НЕК 293, NS0, DG-44 и СНО. Предпочтительно связывающие белки секретируются в среду, в которой культивируют клетки-хозяева, из которой связывающие белки могут быть выделены или очищены, например, с использованием обычных методик. Например, среду можно вносить в колонку для аффинной хроматографии с белком А и/или колонку для аффинной хроматографии с лигандом для каппа-цепи или лигандом для лямбда-цепи и элюировать из нее. Нецелевые соединения биомолекул, включая растворимый агрегат и мультимеры, могут быть эффективно удалены с помощью обычных методик, включая эксклюзионную хроматографию (ЭХ), хроматографию гидрофобного взаимодействия (ХГВ), ионообменную или гидроксиапатитную хроматографию. Продукт может быть немедленно заморожен, например, при  $-70^{\circ}\text{C}$ , помещен в холодильник, или может быть лиофилизирован. Можно применять различные способы очистки белка, и такие способы известны в данной области техники и описаны, например, в Deutscher, *Methods in Enzymology* 182: 83-89 (1990) и Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, 3rd Edition, Springer, NY (1994).

## ПРИМЕРЫ

### Экспрессия и очистка примерных мультиспецифичных связывающих белков

Примерный мультиспецифичный связывающий белок согласно настоящему изобретению, содержащий формат гетеро-МАТ IgG, имеющий первый антигенсвязывающий домен, связывающий сMet, и второй антигенсвязывающий домен, связывающий ВНА10, может быть экспрессирован и очищен по существу следующим образом. В общих чертах, первые области Fab легкой и тяжелой цепей клонируют в векторы экспрессии, такие как векторы экспрессии рЕНГ1 и рЕНК, содержащие константную область аллотипа G1 человека и константную область легкой каппа-цепи человека, соответственно. Оба вектора содержат мышинные лидерные последовательности

каппа-цепи для управления секрецией (WO2014/150973 A1; Lewis S.M., et al., 2014 Nat. Biotechnol. 32, 191-8).

Изменения аминокислотных остатков могут быть введены в связывающие домены с помощью методов, известных в данной области техники, включая: набор для сайт-направленного мутагенеза QuikChange Lightning (Stratagene, Ла-Хойя, Калифорния, США), оптимизированные по кодонам кодирующие области, синтезированные de novo (в одном векторе или отдельных векторах), и тому подобное. Правило нумерации ЕС можно использовать для определения местоположения мутации.

Примерные модифицированные форматы области Fab легкой каппа-цепи и области Fc тяжелой цепи согласно настоящему изобретению представлены в Таблицах 1a и 1b, соответственно (аминокислотные модификации пронумерованы на основе нумерации ЕС).

**Таблица 1a. Примерные модифицированные форматы области Fab легкой каппа-цепи**

V110D + E143K + Q199K	<b>DKK</b>
T109A + V110D + Q199K	<b>ADK</b>
V110D + Q199K	<b>DK</b>
E143K + Q199K	<b>KK</b>

**Таблица 1b. Примерные модифицированные форматы области Fc тяжелой цепи**

Q311R + K317E	<b>RE</b>
---------------	-----------

Варианты реализации различных комбинаций гетеро-MAT IgG, содержащих форматы тяжелой и легкой цепей из Таблиц 1a и 1b, представлены в Таблице 2. Примерные гетеро-MAT IgG включают первый антигенсвязывающий домен, связывающий сMet, и второй антигенсвязывающий домен, связывающий ВНА10; или первый антигенсвязывающий домен, связывающий PD-1, и второй антигенсвязывающий домен, связывающий Tigit. Примерные гетеро-MAT IgG из Таблицы 2 включают различные комбинации модифицированных форматов тяжелой и легкой цепей (из Таблиц 1a и 1b), содержащих первый и второй антигенсвязывающие домены, соответственно, для оценки влияния, если таковое имеется, на экспрессию, сборку и очистку на основе ориентации форматов. Исходные моноклональные антитела и молекулы гетеро-MAT IgG1 (например, молекулы, не включающие модифицированный формат легкой или тяжелой цепи, как указано в Таблицах 1a и 1b) также оценивают в качестве контролей.

Соответствующую клетку-хозяина, такую как CHO, временно трансфицируют системой экспрессии для секреции примерных гетеро-MAT IgG из Таблицы 2. Примерное

гетеро-МАТ IgG детектируют в очищенной среде, в которую секретируются примерные гетеро-МАТ IgG, по поглощению при 280 нм. Как продемонстрировано в Таблице 2, уровни экспрессии форматов антител с модифицированной Fab легкой каппа-цепи и форматов антител с модифицированной Fc тяжелой цепи из Таблицы 1 сравнимы с соответствующими исходными антителами. Таким образом, модификация в соответствии с форматами из Таблиц 1a и 1b не оказывала отрицательного влияния на уровни экспрессии, а в некоторых случаях улучшила титры экспрессии.

**Таблица 2. Количественное определение уровней экспрессии мультиспецифичных связывающих молекул, содержащих модифицированные форматы области Fab легкой каппа-цепи и области Fc тяжелой цепи**

<u>Формат</u>	<u>Титр (мг/л)</u>
Исходное МАТ к сMet (аминокислотная последовательность HC, имеющая SEQ ID NO: 1; аминокислотная последовательность LC, имеющая SEQ ID NO: 2)	349,26
Исходное гетеро-МАТ IgG1 к сMet-ВАН10 (аминокислотная последовательность HC, имеющая SEQ ID NO: 1, и аминокислотная последовательность LC, имеющая SEQ ID NO: 2, для сMet; аминокислотная последовательность HC, имеющая SEQ ID NO: 3, и аминокислотная последовательность LC, имеющая SEQ ID NO: 4, для ВАН10)	96,63
МАТ к сMet (RE на обеих HC) (аминокислотная последовательность HC, имеющая SEQ ID NO: 5; аминокислотная последовательность LC, имеющая SEQ ID NO: 2)	376,32
МАТ к сMet (DКК на обеих LC) (аминокислотная последовательность HC, имеющая SEQ ID NO: 6; аминокислотная последовательность LC, имеющая SEQ ID NO: 7)	141,5
Гетеро-МАТ IgG1 к сMet-ВАН10 (RE только на области Fc тяжелой цепи против сMet) (аминокислотная последовательность HC, имеющая SEQ ID NO: 8, и аминокислотная последовательность LC,	96,66

<p>имеющая SEQ ID NO: 2, для сMet;  аминокислотная последовательность HC, имеющая SEQ ID NO: 3, и аминокислотная последовательность LC, имеющая SEQ ID NO: 4, для ВАН10)</p>	
<p>Гетеро-МАТ IgG1 к сMet-ВАН10  (DKK только на области Fab легкой цепи против сMet)  (аминокислотная последовательность HC, имеющая SEQ ID NO: 1, и аминокислотная последовательность LC, имеющая SEQ ID NO: 7, для сMet;  аминокислотная последовательность HC, имеющая SEQ ID NO: 3, и аминокислотная последовательность LC, имеющая SEQ ID NO: 4, для ВАН10)</p>	<p>177,51</p>
<p>Гетеро-МАТ IgG1 к сMet-ВАН10  (ADK только на области Fab легкой цепи против сMet)  (аминокислотная последовательность HC, имеющая SEQ ID NO: 1, и аминокислотная последовательность LC, имеющая SEQ ID NO: 9, для сMet;  аминокислотная последовательность HC, имеющая SEQ ID NO: 3, и аминокислотная последовательность LC, имеющая SEQ ID NO: 4, для ВАН10)</p>	<p>171,33</p>
<p>Исходное гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-TIGIT  (аминокислотная последовательность HC, имеющая SEQ ID NO: 10, и аминокислотная последовательность LC, имеющая SEQ ID NO: 11, для PD-1;  аминокислотная последовательность HC, имеющая SEQ ID NO: 12, и аминокислотная последовательность LC, имеющая SEQ ID NO: 13, для TIGIT)</p>	<p>107,01</p>
<p>Гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-TIGIT  (DKK только на области Fab легкой цепи против PD-1)  (аминокислотная последовательность HC, имеющая SEQ ID NO: 10, и аминокислотная последовательность LC, имеющая SEQ ID NO: 14, для PD-1;  аминокислотная последовательность HC, имеющая SEQ ID NO: 12, и аминокислотная последовательность LC, имеющая SEQ ID NO: 13, для TIGIT)</p>	<p>99,42</p>

<p>Гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-TIGIT (ADK только на области Fab легкой цепи против PD-1) (аминокислотная последовательность HC, имеющая SEQ ID NO: 10, и аминокислотная последовательность LC, имеющая SEQ ID NO: 15, для PD-1; аминокислотная последовательность HC, имеющая SEQ ID NO: 12, и аминокислотная последовательность LC, имеющая SEQ ID NO: 13, для TIGIT)</p>	<p>80,7</p>
<p>Гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-TIGIT (DK только на области Fab легкой цепи против PD-1) (аминокислотная последовательность HC, имеющая SEQ ID NO: 10, и аминокислотная последовательность LC, имеющая SEQ ID NO: 16, для PD-1; аминокислотная последовательность HC, имеющая SEQ ID NO: 12, и аминокислотная последовательность LC, имеющая SEQ ID NO: 13, для TIGIT)</p>	<p>108,81</p>
<p>Гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-TIGIT (KK только на области Fab легкой цепи против PD-1) (аминокислотная последовательность HC, имеющая SEQ ID NO: 10, и аминокислотная последовательность LC, имеющая SEQ ID NO: 17, для PD-1; аминокислотная последовательность HC, имеющая SEQ ID NO: 12, и аминокислотная последовательность LC, имеющая SEQ ID NO: 13, для TIGIT)</p>	<p>94,62</p>

**Сравнение % проточной фракции и % элюирования примерных модифицированных форматов области Fab легкой каппа-цепи в колонке Карра XL**

5 Мультиспецифичные связывающие белки согласно настоящему изобретению в очищенной среде или выделенные в результате очистки на белке А могут быть подвергнуты второму этапу очистки с использованием предварительно заполненной аффинной колонки CaptureSelect™ Карра XL (Thermo Fisher, № по каталогу 494321001). В  
10 общих чертах, мультиспецифичные связывающие белки согласно настоящему изобретению, выделенные в результате очистки на белке А, обрабатывают на аффинной колонке Карра XL, уравновешенной совместимым буфером, таким как фосфатно-солевой буфер (ФСБ), при pH 7,4. Затем колонку промывают для удаления неспецифичных

связывающихся компонентов. Связанный мультиспецифичный связывающий белок элюируют, например, с помощью градиента pH (например, от 20 mM Трис-буфера с pH 7,0 до 10 mM буфера с цитратом натрия с pH 3,0). Фракции связывающего белка детектируют, например, по поглощению в УФ-области или с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ, а затем объединяют.

Оценивают процент проточной фракции (% FT) и процент элюирования примерных гетеро-МАТ согласно настоящему изобретению после очистки на колонке карра XL по существу, как описано в настоящем документе. В общих чертах, различные форматы антител (как изложено в Таблице 3) обрабатывают на колонке Карра XL. Считается, что материал проточной фракции содержит примеси, такие как гомодимеры, или неправильно собранные антитела, в то время как материал, связанный с лигандом Карра XL (элюируемый материал), считается правильно собранным биспецифичным антителом.

В Таблице 3 продемонстрировано, что исходное МАТ к сMet с форматом ДКК для обеих областей Fab легкой цепи устраняет связывание с колонкой Карра XL, таким образом, 100% антитела собирали в проточной фракции, и препятствует различению целевых и нецелевых соединений антител. Аналогичным образом, % проточной фракции исходного МАТ к сMet и гетеро-МАТ IgG1 к сMet-ВАН10 составлял 2,8% и 5,5%, соответственно, при этом большая часть антител была связана с колонкой Карра XL, что не позволяло различать целевые и нецелевые соединения антител. Напротив, результаты в Таблице 3 демонстрируют, что гетеро-МАТ IgG1 к сMet-ВАН10 с форматом ДКК только для области Fab легкой цепи против сMet приводило в результате к 29,3% соединений проточной фракции и 70,7% элюированного соединения мультиспецифичного связывающего белка, это указывает на то, что формат ДКК для областей Fab легкой каппа-цепи обеспечивает селективное различение и позволяет отделить целевые соединения мультиспецифичного связывающего белка от нецелевых соединений.

Кроме того, в Таблице 3 продемонстрировано, что форматы ДКК и АДК области Fab легкой каппа-цепи на области Fab легкой цепи против PD-1 (гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-Tigit) приводят к 80,72% и 78,24% элюируемых соединений, соответственно, это указывает на то, что оба формата селективно различают целевые элюируемые соединения мультиспецифичного связывающего белка и нецелевые (проточная фракция) соединения.

**Таблица 3. Сравнение % проточной фракции и % элюирования с Карра XL**

<b>Формат</b>	<b>Проточная фракция (FT) (%)</b>	<b>Элюирование (%)</b>
Исходное МАТ к сMet	2,8	97,20

Гетеро-МАТ IgG1 к сMet-ВАН10	5,5	94,5
Исходное МАТ к сMet (с форматами DKK области Fab LC для обоих плеч)	100	Нет детектирования
Гетеро-МАТ IgG1 к сMet-ВАН10 (с форматом DKK области Fab LC только на плече против сMet)	29,3	70,7
Гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-Tigit	0,44	99,56
Гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-Tigit (с областью DKK Fab LC только на плече против PD-1)	19,28	80,72
Гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-Tigit (с областью ADK Fab LC только на плече против PD-1)	21,76	78,24
Гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-Tigit (с областью DK Fab LC только на плече против PD-1)	26,55	73,45
Гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-Tigit (с областью KK Fab LC только на плече против PD-1)	25,21	74,79

В совокупности результаты демонстрируют, что форматы области Fab легкой каппа-цепи из Таблицы 1а при экспрессии только на одной области Fab легкой цепи гетеро-МАТ IgG эффективно различают целевой мультиспецифичный связывающий белок и нецелевые соединения и, таким образом, обеспечивают эффективное разделение и очистку целевого связывающего белка.

**Связывание очищенного мультиспецифичного связывающего белка с белком А и лигандами КарраXL**

**Анализ связывания белка А**

10 Связывание форматов области Fc тяжелой цепи из Таблицы 1b для примерных гетеро-МАТ IgG с лигандом, белком А, можно оценить с помощью ИФА. В общих чертах, 96-луночные плоскодонные планшеты для ИФА покрывают 2 мкг/мл козьего антитела к белку каппа-цепи человека при 100 мкл/лунку и инкубируют в течение ночи при 4°C. На  
15 следующий день планшеты промывают 3 раза промывочным буфером 0,05% ФСБ-Tween 20 (ФСБ-Т) и блокируют 1 час блокирующим буфером (казеин, 200 мкл/лунку) при

комнатной температуре (КТ). Планшеты промывают 3 раза промывочным буфером и связывающие белки (как показано в Таблице 4) добавляют в отдельные лунки при 10 мкг/мл и последовательно разбавляют 1:3 в объеме 100 мкл/лунку в ФСБ-Т. Планшеты инкубируют при КТ в течение 1 часа и промывают 3 раза промывочным буфером. Бiotин-белок А при 0,5 мкг/мл добавляют при 100 мкл/лунку, и планшеты инкубируют в течение 1 часа при КТ, промывают 3 раза, и в каждую лунку добавляют 100 мкл/лунку меченной стрептавидином щелочной фосфатазы (SA-AP). Планшеты инкубируют 30 мин при КТ. Затем планшеты промывают 3 раза и добавляют 100 мкл/лунку субстрата динатриевой соли п-нитрофенилфосфата (PNAP) (Thermo Fisher Scientific). Реакции останавливают, и измеряют оптическую плотность с использованием колориметрического считывающего устройства для микропланшетов, установленного на 405 нм. Результаты представлены в Таблице 4.

**Таблица 4. Связывание белка А очищенных связывающих белков**

Формат	Связывание с белком А ЭК <sub>50</sub> (нМ)
Гетеро-МАТ IgG1 к сMet-ВАН10	0,48
Гетеро-МАТ IgG1 к сMet-ВАН10 (с форматом RE Fc HC только на плече против сMet)	0,56
Исходное МАТ к сMet (с форматом RE HC Fc на обеих HC)	0,98

Результаты демонстрируют, что формат RE области Fc тяжелой цепи при экспрессии как части только области Fc тяжелой цепи против сMet гетеро-МАТ IgG1 к сMet-ВАН10 демонстрирует приблизительно 1,2-кратное снижение связывания с белком А по сравнению с гетеро-МАТ IgG1 к сMet-ВАН10. Когда формат RE области Fc тяжелой цепи экспрессируется как часть обеих областей Fc тяжелой цепи имеет место приблизительно 2-кратное снижение аффинности связывания с белком А по сравнению с исходным антителом. Эти данные демонстрируют, что формат RE области Fc тяжелой цепи позволяет элюировать целевые связывающие молекулы при более высоком pH и отличать их от нецелевых или загрязняющих соединений посредством дифференциальной элюции с белка А.

#### **Анализ связывания Карра XL**

Связывание форматов области Fab легкой цепи из Таблицы 1a для примерных гетеро-МАТ IgG с лигандом Карра XL можно оценить с помощью ИФА. В общих чертах,

96-луночные плоскодонные планшеты для ИФА покрывают 2 мкг/мл козьего антитела против белка IgG человека при 100 мкл/лунку и инкубируют в течение ночи при 4°C. На следующий день планшеты промывают 3 раза промывочным буфером (0,05% ФСБ-Tween 20) и блокируют 1 час блокирующим буфером (казеин, 200 мкл/лунку) при комнатной температуре (КТ). Планшеты промывают 3 раза промывочным буфером и добавляют связывающие белки (как показано в Таблице 5) при 10 мкг/мл и последовательно разводят в соотношении 1:3 при 100 мкл/лунку в ДФСБ (Dulbecco's HyClone). Планшеты инкубируют при КТ в течение 1 часа, промывают 3 раза промывочным буфером и добавляют Biotin-KарраXL при 1 мкг/мл по 100 мкл/лунку. Затем планшеты инкубируют в течение 1 часа при КТ, промывают 3 раза, в каждую лунку добавляют по 100 мкл/лунку SA-AP и инкубируют 30 минут при КТ. Затем планшеты промывают 3 раза и добавляют по 100 мкл/лунку субстрата PNAP. Реакции останавливают, и измеряют оптическую плотность с использованием колориметрического считывающего устройства для микропланшетов, установленного на 405 нм. Результаты представлены в Таблице 5.

15 **Таблица 5. Связывание лиганда Карра XL с очищенными связывающими белками**

Формат	Связывание с лигандом КарраXL ЭК <sub>50</sub> (нМ)
Гетеро-МАТ IgG1 к сMet-ВАН10	0,57
Гетеро-МАТ IgG1 к сMet-ВАН10 (с форматом ДКК области Fab LC только на плече против сMet)	2,50
Гетеро-МАТ IgG1 к сMet-ВАН10 (с форматом АДК области Fab LC только на плече против сMet)	1,27
Исходное МАТ к сMet (с форматом ДКК области Fab LC на обеих LC)	Отсутствует детектируемое связывание

Результаты в Таблице 5 демонстрируют, что как гетеро-МАТ IgG к сMet-ВАН10, имеющее формат ДКК как часть только области Fab легкой цепи против сMet (2,50 нМ), так и гетеро-МАТ IgG к сMet-ВАН10, имеющее АДК как часть только области Fab легкой цепи против сMet (1,27 нМ), проявляют более низкую аффинность связывания с лигандом Карра XL по сравнению с гетеро-МАТ IgG1 к сMet-ВАН10 без форматов области Fab легкой цепи из Таблицы 1а (0,57 нМ). Исходное МАТ к сMet с форматом ДКК, экспрессированным как часть обеих LC, не имело детектируемого связывания с лигандом Карра XL. Эти результаты продемонстрировали, что оба формата ДКК и АДК области Fab легкой цепи при включении в одно «плечо» мультиспецифичного связывающего белка снижают аффинность связывания с лигандом Карра XL, что позволяет удалять

нецелевые или загрязняющие соединения (например, в проточной фракции). Обратите внимание, что это преимущество может быть дополнительно улучшено для мультиспецифичных связывающих белков, в которых форматы области Fab легкой цепи из Таблицы 1а сконструированы для включения только с «плечом» связывающего белка с более высокой экспрессией.

**Анализ чистоты, идентичности и гетерогенности очищенных антител**

Мультиспецифичные связывающие белки, содержащие форматы области Fc тяжелой цепи и/или области Fab легкой цепи из Таблицы 1, подвергаются очистке на белке А (этап 1) с последующей очисткой Карра XL (этап 2). Проточную фракцию и элюируемый материал анализируют на чистоту, идентичность и гетерогенность с помощью стандартных методик, таких как эксклюзионная хроматография (ЭХ), капиллярный электрофорез (лабораторный чип НВ КЭ-ДСН), высокоэффективная жидкостная хроматография (ХГВ-ВЭЖХ) и интактная масс-спектрометрия. ЭХ используется для анализа образцов на процент высокомолекулярных соединений (ВММ), процент фронтального плеча, процент основного пика и процент низкомолекулярных соединений (НММ). Процентные значения рассчитывают с помощью анализа хроматограмм Empower с использованием отношения AUC пиков, элюированных до пика мономера, к общей AUC. НВ КЭ-ДСН используется для количественного определения уровней общего антитела (%) и 1/2 антитела (%) в очищенном материале. Форматы связывающих белков, оцененные на каждом этапе, представлены в Таблицах 6, 7 и 8.

**Таблица 6. (Этап 1) Профиль захваченного белком А материала**

Формат	ЭХ-ВЭЖХ				НВ КЭ-ДСН	
	ВММ (%)	Фронт (%)	Основной пик (%)	НММ (%)	Антитело (%)	1/2 антитела (%)
Гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-TIGIT	7,0	4,0	75,3	13,8	80,2	17,8
Гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-TIGIT (с форматом DKK области Fab LC плеча против PD-1)	4,7	3,2	79,4	12,7	83,3	13,3
Гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-TIGIT (с форматом ADK области Fab LC плеча против PD-1)	4,6	3,7	76,9	14,9	80,8	16,3

Гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-TIGIT (с форматом DK области Fab LC плеча против PD-1)	3,4	5,3	73,5	17,8	78,9	18,4
Гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-TIGIT (с форматом КК области Fab LC плеча против PD-1)	3,7	4,2	76,0	16,1	78,0	16,3

Как показано в Таблице 6, этап 1 (очистка на белке А) показывает, что форматы области Fab легкой каппа-цепи из Таблицы 1а не оказывают отрицательного влияния на высокомолекулярные соединения по сравнению с контролем (гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-TIGIT), это демонстрирует, что форматы области Fab легкой цепи из Таблицы 1а не оказывают отрицательного влияния на сборку мультиспецифичного связывающего белка. Кроме того, основной пик форматов области Fab легкой цепи из Таблицы 1а был сравним с контролем (гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-TIGIT), и не наблюдали значимых различий между двойным и тройным форматами области Fab легкой цепи из Таблицы 1а.

10 **Таблица 7. (Этап 2) Профиль элюирования Карра XL**

Формат антитела	ЭХ-ВЭЖХ				КЭ-ДСН в невосстанавливающих условиях		ХГВ-ВЭЖХ
	ВММ (%)	Фронт (%)	Основной пик (%)	НММ (%)	Антитело (%)	1/2 антитела (%)	Основной пик (%)
Гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-TIGIT	5,9	3,3	83,1	7,7	80,2	17,8	НО
Гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-TIGIT (формат ДКК)	3,6	0,0	95,7	0,7	94,3	4,1	96,1

области Fab LC только на плече против PD- 1)							
Гетеро- МАТ IgG1 к PD-1- TIGIT (формат ADK области Fab LC только на плече против PD- 1)	2,5	0,0	95,7	0,9	95,7	3,0	97,1
Гетеро- МАТ IgG1 к PD-1- TIGIT (формат DK области Fab LC только на плече против PD- 1)	2,3	0,0	97,1	0,7	95,6	2,6	96,6
Гетеро- МАТ IgG1 к PD-1- TIGIT (формат KK области	2,8	0,0	96,2	0,9	94,0	3,8	95,1

Fab LC только на плече против PD- 1)							
--	--	--	--	--	--	--	--

Как показано в Таблице 7, профиль элюирования на этапе 2 (очистка Карра XL) показывает, что чистота основного пика увеличилась до более чем 95% для всех форматов области Fab легкой каппа-цепи из Таблицы 1а по сравнению с примерно 83% для соответствующих связывающих белков, в которых отсутствуют форматы области Fab легкой каппа-цепи из Таблицы 1а, раскрытые в настоящем документе. Результаты также показывают, что содержание примесей, о котором свидетельствует пик НММ, снижается до менее чем 1,0% для форматов области Fab легкой каппа-цепи из Таблицы 1а по сравнению с 7,7% для соответствующих связывающих белков, в которых отсутствуют форматы области Fab легкой каппа-цепи из Таблицы 1а. Сходным образом, профиль НВ КЭ-ДСН показывает, что количество полных связывающих белков, содержащих форматы области Fab легкой каппа-цепи из Таблицы 1а, составляло более 94%, в то время как связывающие белки, в которых отсутствуют форматы области Fab легкой каппа-цепи из Таблицы 1а, составляли только 80,2%. Кроме того, профиль 1/2 антитела для связывающих белков, содержащих форматы области Fab легкой каппа-цепи из Таблицы 1а, составлял менее 4%, в то время как связывающие белки, в которых отсутствуют форматы области Fab легкой каппа-цепи из Таблицы 1а, составляли 17,8%. Не наблюдали значимых различий в профилях элюирования между различными связывающими белками, содержащими различные форматы области Fab легкой каппа-цепи из Таблицы 1а.

**Таблица 8. (Этап 2) Профиль проточной фракции для Карра XL**

Формат	ЭХ-ВЭЖХ			НВ КЭ-ДСН	
	Фронт (%)	Основной пик (%)	НММ (%)	Антитело (%)	½ антитела (%)
Гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-TIGIT	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных
Гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-TIGIT (формат ДКК области Fab LC только на плече против PD-1)	21,5	8,9	69,6	23,1	62,5

Гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-TIGIT (формат АДК области Fab LC только на плече против PD-1)	22,3	8,8	68,9	25,0	51,7
Гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-TIGIT (формат ДК области Fab LC только на плече против PD-1)	23,8	14,1	62,0	25,4	62,6
Гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-TIGIT (формат КК области Fab LC только на плече против PD-1)	23,7	8,4	68,0	23,3	72,7

В Таблице 8 продемонстрировано, что нецелевые примеси (фронт и НММ, %) эффективно отделяются в проточной фракции Карра XL, а целевой мультиспецифичный связывающий белок, содержащий формат, указанный в Таблице 1, обогащается при элюировании. Немодифицированный контроль не наблюдали в профиле проточной фракции, это указывает на то, что все немодифицированные гетеро-МАТ связывались с колонкой Карра XL.

Результаты, представленные в Таблицах 3-8, демонстрируют, что модифицированные форматы области Fab легкой каппа-цепи из Таблицы 1а обеспечивают надежную очистку, селективную дифференциацию и возможность отделения целевого мультиспецифичного связывающего белка от нецелевых соединений и/или примесей.

**Оценка термической стабильности примерных мультиспецифичных связывающих белков**

Термостабильность примерных мультиспецифичных связывающих белков согласно настоящему изобретению оценивают после очистки на белке А и Карра XL с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Результаты (температура разворачивания сообщается как Tm1) представлены в Таблице 9.

**Таблица 9. Оценка термической стабильности примерных связывающих белков**

Формат	Tm1 (°C)
Гетеро-МАТ IgG1 к сMet-ВАН10	70,9
Исходное МАТ к сMet	71
Исходное МАТ к сMet (с форматом RE Fc HC на обеих HC)	58,2
Исходное МАТ к сMet (с форматом ДКК области Fab LC на обеих LC)	70,9

Гетеро-МАТ IgG1 к сMet-ВАН10 (с форматом RE Fc HC на плече против сMet)	66,9
Гетеро-МАТ IgG1 к сMet-ВАН10 (с форматом DKK области Fab LC на плече против сMet)	70,1
Гетеро-МАТ IgG1 к сMet-ВАН10 (с форматом ADK области Fab LC на плече против сMet)	70,5
Гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-TIGIT	64,59
Гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-TIGIT (с форматом DKK области Fab LC на плече против PD-1)	64,5
Гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-TIGIT (с форматом ADK области Fab LC на плече против PD-1)	64,35
Гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-TIGIT (с форматом DK области Fab LC на плече против PD-1)	64,67
Гетеро-МАТ IgG1 к PD-1-TIGIT (с форматом KK области Fab LC на плече против PD-1)	64,71

В Таблице 9 продемонстрировано, что формат RE области Fc тяжелой цепи (на  
 5 обоих плечах исходного антитела к сMet) влиял на термическую стабильность, однако  
 никакого эффекта не наблюдали, когда формат RE области Fc тяжелой цепи  
 экспрессировали как часть только одного плеча примерного гетеро-МАТ IgG1. Кроме  
 того, все модифицированные форматы Fab легкой каппа-цепи продемонстрировали  
 сравнимую термостабильность по сравнению с соответствующими  
 немодифицированными исходными молекулами.

**Анализ аффинности связывания примерных мультиспецифичных связывающих  
 10 белков**

Аффинность связывания примерных мультиспецифичных связывающих белков  
 согласно настоящему изобретению оценивают с помощью ИФА. В общих чертах, 384-  
 луночные плоскодонные планшеты для ИФА покрывают 1 мкг/мл белка против Fc  
 человека при 20 мкл/лунку и инкубируют в течение ночи при 4°C. На следующий день  
 15 планшеты промывают 3 раза промывочным буфером (0,05% ФСБ-Tween 20) и блокируют  
 1 час блокирующим буфером (казеин, 60 мкл/лунку) при комнатной температуре (КТ).  
 Планшеты промывают 3 раза промывочным буфером и добавляют связывающие белки,  
 показанные в Таблице 10, при 1 мкг/мл с тремя повторами по 20 мкл/лунку в ДФСБ  
 (Dulbecco's HyClone). Планшеты инкубируют при КТ в течение 1 часа, промывают 3 раза  
 20 промывочным буфером, добавляют титрованные антигены при 20 мкл/лунку и

инкубируют в течение 60 минут при КТ. Планшеты промывают 3 раза, добавляют 20 мкл/лунку субстрата NAAP и инкубируют в течение 20 мин. Планшеты промывают 3 раза, добавляют субстрат PNPP при 20 мкл/лунку, реакции останавливают и измеряют оптическую плотность с использованием колориметрического считывающего устройства для микропланшетов, установленного на 405 нм. Результаты представлены в Таблице 10.

**Таблица 10. Анализ аффинности связывания**

Формат	Аффинность связывания (с TIGIT-ECD человека) ЭК <sub>50</sub> (нМ)	Аффинность связывания (с PD-1-ECD человека) ЭК <sub>50</sub> (нМ)
Гетеро-MAT IgG1 к PD-1-TIGIT	0,0681	0,0070
Гетеро-MAT IgG1 к PD-1-TIGIT (формат ADK области Fab LC только на плече против PD-1)	0,0108	0,0303
Гетеро-MAT IgG1 к PD-1-TIGIT (формат DKK области Fab LC только на плече против PD-1)	0,0454	0,0108
Гетеро-MAT IgG1 к PD-1-TIGIT (формат DK области Fab LC только на плече против PD-1)	0,0261	0,0097
Гетеро-MAT IgG1 к PD-1-TIGIT (формат KK области Fab LC только на плече против PD-1)	0,0182	0,0093

Эти результаты, представленные в Таблице 10, демонстрируют, что примерные мультиспецифичные связывающие белки, содержащие модифицированные форматы области Fab легкой каппа-цепи из Таблицы 1а, сохраняют сравнимую и в некоторых случаях улучшенную аффинность связывания с целевыми антигенами (по сравнению с немодифицированным исходным мультиспецифичным связывающим белком).

#### **Анализ иммуногенности *in silico***

Иммуногенность модифицированных форматов областей Fc тяжелой цепи и областей Fab легкой цепи примерных мультиспецифичных связывающих белков анализируют с помощью анализа иммуногенности *in silico*, используя анализ базы данных иммунных эпитопов (IEDB). Рассчитывают оценки иммуногенности (IG) и оценки редкости (частота использования аминокислот в соответствующем месте по отношению к репертуару Ig человека) последовательностей антител (более низкая оценка указывает на более низкую иммуногенность). Результаты представлены в Таблицах 11а и 11б.

**Таблица 11а. Анализ иммуногенности области Fab легкой цепи**

<b>Формат LC</b>	<b>Оценка иммуногенности LC</b>	<b>Оценка редкости LC</b>
Гетеро-MAT IgG1 к PD-1-TIGIT	1,986	6,253
Гетеро-MAT IgG1 к PD-1-TIGIT (формат DKK области Fab LC только на плече против PD-1)	1,977	6,253
Гетеро-MAT IgG1 к PD-1-TIGIT (формат ADK области Fab LC только на плече против PD-1)	1,982	6,253
Гетеро-MAT IgG1 к PD-1-TIGIT (формат DK области Fab LC только на плече против PD-1)	1,977	6,253
Гетеро-MAT IgG1 к PD-1-TIGIT (формат KK области Fab LC только на плече против PD-1)	1,986	6,253
Исходное МАТ к сMet	1,726	16,244
Исходное МАТ к сMet (с областью DKK Fab LC – оценка одной LC)	1,717	16,244

10 **Таблица 11б. Анализ иммуногенности области Fc тяжелой цепи**

<b>Формат HC</b>	<b>Оценка иммуногенности HC</b>	<b>Оценка редкости HC</b>
Исходное МАТ к сMet	11,518	28,486
Исходное МАТ к сMet	11,518	28,486

(с областью RE Fc HC – оценка одной HC)		
---	--	--

5 Результаты, изложенные в Таблицах 11a и 11b, показывают, что модифицированные форматы области Fab легкой цепи и области Fc тяжелой цепи из Таблиц 1a и 1b демонстрируют оценки иммуногенности и редкости, сравнимые с таковыми соответствующих немодифицированных исходных молекул, это свидетельствует о том, что модифицированные форматы не увеличивают риск иммуногенности.

**Последовательности**

**SEQ ID NO: 1 (примерная HC против cMet с подчеркнутой областью Fab)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRKAPGKGLEWVGMIDPSNSD  
TRFNPEFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQGLV  
5 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVATGPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  
EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK  
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV  
YTLPPSREEMTDNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLMSDGSFFLA  
10 SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

**SEQ ID NO: 2 (примерная LC против cMet)**

RIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQDKPGKAPKLLIYWAST  
RESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYAYPWTFGQGTKVEIKRTVAAP  
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCYLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST  
15 YSLWSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**SEQ ID NO: 3 (примерная HC против VAh10 с подчеркнутой областью Fab)**

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYLHWVRYAPGQGLEWMGWIYPGNV  
HAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSWEGFPYWGRGTTVTV  
SSASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ  
20 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPDSGDKTHTCPPCPAPEAA  
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRRPRVYTLPP  
SREEMTKNQVSLVCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSVLTV  
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

**SEQ ID NO: 4 (примерная LC против VAh10)**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGINVAWYQRKPGDAPKSLISSASYRYSRVPS  
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQYDTPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSK  
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTL  
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**SEQ ID NO: 5 (примерная HC против cMet, имеющая формат RE, подчеркнутый и выделенный курсивом, с подчеркнутой областью Fab)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRKAPGKGLEWVGMIDPSNSD  
TRFNPEFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQGLV  
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVATGPA  
35 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP

EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK  
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHRDWLNGEEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY  
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK  
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5 **SEQ ID NO: 6 (примерная HC против cMet с подчеркнутой областью Fab)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRKAPGKGLEWVGMIDPSNSD  
TRFNPEFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQGLV  
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVATGPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP

10 EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK  
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV  
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS  
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

15 **SEQ ID NO: 7 (примерная LC против cMet, имеющая формат DKK, показанный подчеркиванием)**

RIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQDKPGKAPKLLIYWAST  
RESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYAYPWTFGQGTKVEIKRTDAAP  
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCYLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS  
YSLWSTLTLKADYEKHKVYACEVTHKGLSSPVTKSFNRGEC

20 **SEQ ID NO: 8 (примерная HC против cMet, имеющая формат RE, подчеркнутый и выделенный курсивом, с подчеркнутой областью Fab)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRKAPGKGLEWVGMIDPSNSD  
TRFNPEFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQGLV  
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVATGPA  
25 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP

EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK  
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHRDWLNGEEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY  
TLPPSREEMTDNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLMSDGSFFLAS  
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30 **SEQ ID NO: 9 (примерная LC против cMet, имеющая формат ADK, показанный подчеркиванием)**

RIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSVSSSVSSIYLHWYQDKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPS  
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQVYSGYPLTFGGGTKVEIKRADAAPSVFIFPPS  
DEQLKSGTASVVCYLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTYSLWSTL  
35 TLSKADYEKHKVYACEVTHKGLSSPVTKSFNRGEC

**SEQ ID NO: 10 (примерная HC против PD1 с подчеркнутой областью Fab)**

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRYAPGQGLEWMGLIIPSFDTAG  
YAQKFQGRVAITVDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAEHSSTGTFDYWGRGTLVT  
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVADYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  
5 QSSGLYSLASVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDERVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA  
AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR  
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVY  
LPPSREEMTDNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLMSDGSFFLASK  
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

10 **SEQ ID NO: 11 (примерная LC против PD1)**

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQGISSWLAWYQRKPGDAPKLLISAASSLQSGVPS  
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANHLPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD  
KQLKSGTARVVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLISTLT  
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

15 **SEQ ID NO: 12 (примерная HC против TIGIT с подчеркнутой областью Fab)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDSSYGVPWVRKAPGKGLEWVGYIDPIFGPTY  
YADEVKGRFTISADDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARDYSYGYAYALDIWGQTL  
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP  
20 EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK  
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPRRPRV  
YTLPPSREEMTKNQVSLVCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY  
SVLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

**SEQ ID NO: 13 (примерная LC против TIGIT)**

25 RIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCQASQRISPYLAWYLDKPGQPPQLISRASKLASGVPDR  
FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQSYVHTSSGYAFGGGKTKVEIKRTVAAPSVFIF  
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS  
TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

30 **SEQ ID NO: 14 (примерная LC против DKK, имеющая формат DKK, показанный подчеркиванием)**

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQGISSWLAWYQRKPGDAPKLLISAASSLQSGVPS  
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANHLPTFGGGTKVEIKRTDAAPSVFIFPPSD  
KQLKSGTARVVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLISTLT  
LSKADYEKHKVYACEVTHKGLSSPVTKSFNRGEC

**SEQ ID NO: 15 (примерная LC против PD1, имеющая формат АДК, показанный подчеркиванием)**

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQRKPGDAPKLLISAASSLQSGVPS  
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANHLPTFTGGGKVEIKRADAAPSVFIFPPS  
5 DKQLKSGTARVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLISTL  
TLISKADYEKHKVYACEVTHKGLSSPVTKSFNRGEC

**SEQ ID NO: 16 (примерная LC против PD1, имеющая формат ДК, показанный подчеркиванием)**

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQRKPGDAPKLLISAASSLQSGVPS  
10 RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANHLPTFTGGGKVEIKRDAAPSVFIFPPSD  
KQLKSGTARVVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLISTLT  
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**SEQ ID NO: 17 (примерная LC против PD1, имеющая формат КК, показанный подчеркиванием)**

15 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQRKPGDAPKLLISAASSLQSGVPS  
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANHLPTFTGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD  
KQLKSGTARVVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLISTLT  
LSKADYEKHKVYACEVTHKGLSSPVTKSFNRGEC

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мультиспецифичный связывающий белок, который связывает первый антиген и второй антиген, причем указанный мультиспецифичный связывающий белок содержит:

5 первый антигенсвязывающий домен, содержащий первую область Fab легкой цепи и первую область Fab тяжелой цепи, причем указанная первая область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь и содержит:

лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС);

10 лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС), лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС) и аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС);

лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС), лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС) и аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС);

15 лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС), лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС), аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС);

20 аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС);

аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС), лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС) и аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС);

25 аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС);

аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС), лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС) и аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС);

30 аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС);

аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС); или

аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС); и

второй антигенсвязывающий домен, содержащий вторую область Fab легкой цепи и вторую область Fab тяжелой цепи, причем указанный первый антигенсвязывающий домен связывает первый антиген, и указанный второй антигенсвязывающий домен связывает второй антиген.

5 2. Мультиспецифичный связывающий белок по п. 1, отличающийся тем, что:

если указанная первая область Fab легкой цепи содержит лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС), то указанная вторая область Fab легкой цепи не содержит лизина в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС) и лизина в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС);

10 если указанная первая область Fab легкой цепи содержит лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС), лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС) и аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС), то указанная вторая область Fab легкой цепи не содержит лизина в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС), лизина в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС) и аланина в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС);

15 если указанная первая область Fab легкой цепи содержит лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС), лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС) и аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС), то указанная вторая область Fab легкой цепи не содержит лизина в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС), лизина в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС) и аспарагиновой кислоты в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС);

20 если указанная первая область Fab легкой цепи содержит лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС), лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС), аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС), то указанная вторая область Fab легкой цепи не содержит лизина в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС), лизина в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС), аланина в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС);

25 если указанная первая область Fab легкой цепи содержит аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС), то указанная вторая область Fab легкой цепи не содержит аспарагиновой кислоты в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС) и лизина в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС);

30 если указанная первая область Fab легкой цепи содержит аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС), лизин в аминокислотном остатке 143

(нумерация ЕС) и аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС), то указанная вторая область Fab легкой цепи не содержит аспарагиновой кислоты в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС), лизина в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС) и аланина в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС);

5           если указанная первая область Fab легкой цепи содержит аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС), то указанная вторая область Fab легкой цепи не содержит аспарагиновой кислоты в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС) и лизина в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС);

10           если указанная первая область Fab легкой цепи содержит аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС), лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС) и аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС), то указанная вторая область Fab легкой цепи не содержит аспарагиновой кислоты в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС), лизина в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС) и аланина в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС);

15           если указанная первая область Fab легкой цепи содержит аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС), то указанная вторая область Fab легкой цепи не содержит аланина в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и лизина в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС);

20           если указанная первая область Fab легкой цепи содержит аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС), то указанная вторая область Fab легкой цепи не содержит аланина в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и лизина в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС); и

25           если указанная первая область Fab легкой цепи содержит аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС), то указанная вторая область Fab легкой цепи не содержит аланина в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и аспарагиновой кислоты в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС).

30           3. Мультиспецифичный связывающий белок, который связывает первый антиген и второй антиген, отличающийся тем, что указанный мультиспецифичный связывающий белок содержит:

первый антигенсвязывающий домен, содержащий первую область Fab легкой цепи и первую область Fab тяжелой цепи, причем указанная первая область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь и содержит лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС); и

второй антигенсвязывающий домен, содержащий вторую область Fab легкой цепи и вторую область Fab тяжелой цепи, причем указанный первый антигенсвязывающий домен связывает первый антиген, и указанный второй антигенсвязывающий домен связывает второй антиген.

4. Мультиспецифичный связывающий белок по п. 3, отличающийся тем, что указанная первая область Fab легкой цепи дополнительно содержит аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС).

5. Мультиспецифичный связывающий белок по любому из пп. 3 или 4, отличающийся тем, что указанная первая область Fab легкой цепи дополнительно содержит аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС).

6. Мультиспецифичный связывающий белок, который связывает первый антиген и второй антиген, причем указанный мультиспецифичный связывающий белок содержит:

первый антигенсвязывающий домен, содержащий первую область Fab легкой цепи и первую область Fab тяжелой цепи, причем указанная первая область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь и содержит аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС); и

второй антигенсвязывающий домен, содержащий вторую область Fab легкой цепи и вторую область Fab тяжелой цепи, при этом указанный первый антигенсвязывающий домен связывает первый антиген, и указанный второй антигенсвязывающий домен связывает второй антиген.

7. Мультиспецифичный связывающий белок по п. 6, отличающийся тем, что указанная первая область Fab легкой цепи дополнительно содержит аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС).

8. Мультиспецифичный связывающий белок, который связывает первый антиген и второй антиген, причем указанный мультиспецифичный связывающий белок содержит:

первый антигенсвязывающий домен, содержащий первую область Fab легкой цепи и первую область Fab тяжелой цепи, причем указанная первая область Fab

легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь и содержит аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС); и

второй антигенсвязывающий домен, содержащий вторую область Fab легкой цепи и вторую область Fab тяжелой цепи,

при этом указанный первый антигенсвязывающий домен связывает первый антиген, и указанный второй антигенсвязывающий домен связывает второй антиген.

9. Мультиспецифичный связывающий белок по п. 8, отличающийся тем, что указанная первая область Fab легкой цепи дополнительно содержит аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС).

10. Мультиспецифичный связывающий белок, который связывает первый антиген и второй антиген, причем указанный мультиспецифичный связывающий белок содержит:

первый антигенсвязывающий домен, содержащий первую область Fab легкой цепи и первую область Fab тяжелой цепи, причем указанная первая область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь и содержит аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС); и

второй антигенсвязывающий домен, содержащий вторую область Fab легкой цепи и вторую область Fab тяжелой цепи,

при этом указанный первый антигенсвязывающий домен связывает первый антиген, и указанный второй антигенсвязывающий домен связывает второй антиген.

11. Мультиспецифичный связывающий белок, который связывает первый антиген и второй антиген, причем указанный мультиспецифичный связывающий белок содержит:

первый антигенсвязывающий домен, содержащий первую область Fab легкой цепи и первую область Fab тяжелой цепи, причем указанная первая область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь и содержит аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС); и

второй антигенсвязывающий домен, содержащий вторую область Fab легкой цепи и вторую область Fab тяжелой цепи,

при этом указанный первый антигенсвязывающий домен связывает первый антиген, и указанный второй антигенсвязывающий домен связывает второй антиген.

12. Мультиспецифичный связывающий белок, который связывает первый антиген и второй антиген, причем указанный мультиспецифичный связывающий белок содержит:

5 первый антигенсвязывающий домен, содержащий первую область Fab легкой цепи и первую область Fab тяжелой цепи, причем указанная первая область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь и содержит аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС); и

10 второй антигенсвязывающий домен, содержащий вторую область Fab легкой цепи и вторую область Fab тяжелой цепи,

при этом указанный первый антигенсвязывающий домен связывает первый антиген, и указанный второй антигенсвязывающий домен связывает второй антиген.

13. Мультиспецифичный связывающий белок по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что указанный первый антигенсвязывающий домен дополнительно содержит первую область Fc тяжелой цепи.

14. Мультиспецифичный связывающий белок по п. 13, отличающийся тем, что указанная первая область Fc тяжелой цепи содержит константную область IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека.

15. Мультиспецифичный связывающий белок по любому из пп. 1-14, отличающийся тем, что указанный второй антигенсвязывающий домен дополнительно содержит вторую область Fc тяжелой цепи.

16. Мультиспецифичный связывающий белок по п. 15, отличающийся тем, что указанная вторая область Fc тяжелой цепи содержит константную область IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека.

17. Мультиспецифичный связывающий белок по любому из пп. 13-16, отличающийся тем, что указанная первая область Fc тяжелой цепи содержит аргинин в аминокислотном остатке 311 (нумерация ЕС) и глутаминовую кислоту в аминокислотном остатке 317 (нумерация ЕС).

18. Мультиспецифичный связывающий белок по любому из пп. 13-17, отличающийся тем, что указанная вторая область Fc тяжелой цепи содержит аргинин в аминокислотном остатке 311 (нумерация ЕС) и глутаминовую кислоту в аминокислотном остатке 317 (нумерация ЕС).

19. Мультиспецифичный связывающий белок по любому из пп. 13-18, отличающийся тем, что как указанная первая, так и указанная вторая области Fc тяжелой цепи содержат константную область IgG1 человека; обе указанные области содержат

константную область IgG2 человека; или обе указанные области содержат константную область IgG4 человека.

20. Мультиспецифичный связывающий белок по любому из пп. 13-19, отличающийся тем, что как указанная первая, так и указанная вторая области Fc тяжелой цепи содержат аргинин в аминокислотном остатке 311 (нумерация ЕС) и глутаминовую кислоту в аминокислотном остатке 317 (нумерация ЕС).
21. Мультиспецифичный связывающий белок по любому из пп. 1-20, отличающийся тем, что указанная вторая область Fab легкой цепи не содержит аланина в аминокислотном остатке 109; не содержит аспарагиновой кислоты в аминокислотном остатке 110; не содержит лизина в аминокислотном остатке 143; или не содержит лизина в аминокислотном остатке 199.
22. Мультиспецифичный связывающий белок по любому из пп. 1-21, отличающийся тем, что указанная вторая область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь.
23. Мультиспецифичный связывающий белок по любому из пп. 1-22, отличающийся тем, что указанная вторая область Fab легкой цепи представляет собой легкую ламбда-цепь.
24. Способ очистки мультиспецифичного связывающего белка, содержащего первый антигенсвязывающий домен, который связывает первый антиген, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает второй антиген, причем указанный способ включает:
- введение в указанный первый антигенсвязывающий домен первой области Fab легкой цепи, содержащей лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС), причем указанная первая область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь;
- экспрессию указанного мультиспецифичного связывающего белка, при этом указанный первый антигенсвязывающий домен соединяется с указанным вторым антигенсвязывающим доменом; и
- обработку указанного мультиспецифичного связывающего белка на колонке для аффинной хроматографии; и
- выделение очищенного мультиспецифичного связывающего белка.
25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что указанный этап введения дополнительно включает введение в указанный первый антигенсвязывающий домен аланина в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС).

26. Способ по любому из пп. 24 или 25, отличающийся тем, что указанный этап введения дополнительно включает введение в указанный первый антигенсвязывающий домен аспарагиновой кислоты в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС).

27. Способ очистки мультиспецифичного связывающего белка, содержащего первый антигенсвязывающий домен, который связывает первый антиген, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает второй антиген, причем указанный способ включает:

введение в указанный первый антигенсвязывающий домен первой области Fab легкой цепи, содержащей аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС), причем указанная первая область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь;

экспрессию указанного мультиспецифичного связывающего белка, при этом указанный первый антигенсвязывающий домен соединяется с указанным вторым антигенсвязывающим доменом; и

обработку указанного мультиспецифичного связывающего белка на колонке для аффинной хроматографии; и

выделение очищенного мультиспецифичного связывающего белка.

28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что указанный этап введения дополнительно включает введение в указанный первый антигенсвязывающий домен аланина в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС).

29. Способ очистки мультиспецифичного связывающего белка, содержащего первый антигенсвязывающий домен, который связывает первый антиген, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает второй антиген, причем указанный способ включает:

введение в указанный первый антигенсвязывающий домен первой области Fab легкой цепи, содержащей аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС), причем указанная первая область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь;

экспрессию указанного мультиспецифичного связывающего белка, при этом указанный первый антигенсвязывающий домен соединяется с указанным вторым антигенсвязывающим доменом; и

обработку указанного мультиспецифичного связывающего белка на колонке для аффинной хроматографии; и

выделение очищенного мультиспецифичного связывающего белка.

30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что указанный этап введения дополнительно включает введение в указанный первый антигенсвязывающий домен аланина в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС).

31. Способ очистки мультиспецифичного связывающего белка, содержащего первый антигенсвязывающий домен, который связывает первый антиген, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает второй антиген, причем указанный способ включает:

введение в указанный первый антигенсвязывающий домен первой области Fab легкой цепи, содержащей аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 143 (нумерация ЕС), причем указанная первая область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь;

экспрессию указанного мультиспецифичного связывающего белка, при этом указанный первый антигенсвязывающий домен соединяется с указанным вторым антигенсвязывающим доменом; и

обработку указанного мультиспецифичного связывающего белка на колонке для аффинной хроматографии; и

выделение очищенного мультиспецифичного связывающего белка.

32. Способ очистки мультиспецифичного связывающего белка, содержащего первый антигенсвязывающий домен, который связывает первый антиген, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает второй антиген, причем указанный способ включает:

введение в указанный первый антигенсвязывающий домен первой области Fab легкой цепи, содержащей аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и лизин в аминокислотном остатке 199 (нумерация ЕС), причем указанная первая область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь;

экспрессию указанного мультиспецифичного связывающего белка, при этом указанный первый антигенсвязывающий домен соединяется с указанным вторым антигенсвязывающим доменом; и

обработку указанного мультиспецифичного связывающего белка на колонке для аффинной хроматографии; и

выделение очищенного мультиспецифичного связывающего белка.

33. Способ очистки мультиспецифичного связывающего белка, содержащего первый антигенсвязывающий домен, который связывает первый антиген, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает второй антиген, причем указанный способ включает:

введение в указанный первый антигенсвязывающий домен первой области Fab легкой цепи, содержащей аланин в аминокислотном остатке 109 (нумерация ЕС) и аспарагиновую кислоту в аминокислотном остатке 110 (нумерация ЕС), причем указанная первая область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь;

5 экспрессию указанного мультиспецифичного связывающего белка, при этом указанный первый антигенсвязывающий домен соединяется с указанным вторым антигенсвязывающим доменом; и

обработку указанного мультиспецифичного связывающего белка на колонке для аффинной хроматографии; и

10 выделение очищенного мультиспецифичного связывающего белка.

34. Способ по любому из пп. 24-33, отличающийся тем, что указанный этап введения дополнительно включает введение в указанный первый антигенсвязывающий домен первой области Fc тяжелой цепи.

15 35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что указанная первая область Fc тяжелой цепи содержит константную область IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека.

36. Способ по любому из пп. 24-35, отличающийся тем, что указанный этап введения дополнительно включает введение в указанный второй антигенсвязывающий домен второй области Fc тяжелой цепи.

20 37. Способ по п. 36, отличающийся тем, что указанная вторая область Fc тяжелой цепи содержит константную область IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека.

38. Способ по любому из пп. 34-37, отличающийся тем, что указанный этап введения дополнительно включает введение в указанную первую область Fc тяжелой цепи аргинина в аминокислотном остатке 311 (нумерация ЕС) и глутаминовой кислоты в аминокислотном остатке 317 (нумерация ЕС).

25 39. Способ по любому из пп. 34-38, отличающийся тем, что указанный этап введения дополнительно включает введение в указанную вторую область Fc тяжелой цепи аргинина в аминокислотном остатке 311 (нумерация ЕС) и глутаминовой кислоты в аминокислотном остатке 317 (нумерация ЕС).

30 40. Способ по любому из пп. 24-39, отличающийся тем, что как указанная первая область Fc тяжелой цепи, так и указанная вторая область Fc тяжелой цепи содержат константную область IgG1 человека; обе указанные области содержат константную область IgG2 человека; или обе указанные области содержат константную область IgG4 человека.

35 41. Способ по любому из пп. 24-40, отличающийся тем, что указанный этап введения дополнительно включает введение как в указанную первую область Fc тяжелой цепи,

так и в указанную вторую область Fc тяжелой цепи аргинина в аминокислотных остатках 311 (нумерация ЕС) и глутаминовой кислоты в аминокислотных остатках 317 (нумерация ЕС).

- 5 42. Способ по любому из пп. 24-41, отличающийся тем, что указанная вторая область Fab легкой цепи не содержит аланина в аминокислотном остатке 109; не содержит аспарагиновой кислоты в аминокислотном остатке 110; не содержит лизина в аминокислотном остатке 143; или не содержит лизина в аминокислотном остатке 199.
- 10 43. Способ по любому из пп. 24-41, отличающийся тем, что указанная вторая область Fab легкой цепи не содержит аланина в аминокислотном остатке 109; не содержит аспарагиновой кислоты в аминокислотном остатке 110; не содержит лизина в аминокислотном остатке 143; и не содержит лизина в аминокислотном остатке 199.
44. Способ по любому из пп. 24-43, отличающийся тем, что указанная вторая область Fab легкой цепи представляет собой легкую каппа-цепь.
- 15 45. Способ по любому из пп. 24-43, отличающийся тем, что указанная вторая область Fab легкой цепи представляет собой легкую лямбда-цепь.
46. Способ по любому из пп. 24-45, отличающийся тем, что указанная колонка для аффинной хроматографии содержит аффинный лиганд для каппа-цепи.
47. Способ по любому из пп. 24-46, отличающийся тем, что указанная колонка для аффинной хроматографии содержит аффинный лиганд для лямбда-цепи.
- 20 48. Способ по любому из пп. 24-47, отличающийся тем, что указанная колонка для аффинной хроматографии содержит белок А.
49. Способ по любому из пп. 24-48, отличающийся тем, что указанная вторая область Fab легкой цепи связывается с указанной колонкой для аффинной хроматографии с большей аффинностью, чем указанная первая область Fab легкой цепи.
- 25 50. Способ по любому из пп. 24-49, отличающийся тем, что указанная первая область Fab легкой цепи не связывается с указанной колонкой для аффинной хроматографии.
51. Способ по любому из пп. 24-50, дополнительно включающий этап:  
обработки указанного очищенного мультиспецифичного связывающего белка на второй колонке для аффинной хроматографии после этапа выделения очищенного  
30 мультиспецифичного связывающего белка; и  
выделения очищенного мультиспецифичного связывающего белка после этапа обработки указанного очищенного мультиспецифичного связывающего белка на второй колонке для аффинной хроматографии.
52. Способ по п. 51, отличающийся тем, что указанная вторая колонка для аффинной  
35 хроматографии содержит аффинный лиганд для каппа-цепи.

53. Способ по любому из пп. 51 или 52, отличающийся тем, что указанная вторая колонка для аффинной хроматографии содержит аффинный лиганд для лямбда-цепи.
54. Способ по любому из пп. 51-53, отличающийся тем, что указанная вторая колонка для аффинной хроматографии содержит белок А.
- 5 55. Способ по любому из пп. 51-54, отличающийся тем, что указанная вторая область Fab легкой цепи связывается с указанной второй колонкой для аффинной хроматографии с большей аффинностью, чем указанная первая область Fab легкой цепи.
56. Способ по любому из пп. 51-55, отличающийся тем, что указанная первая область Fab легкой цепи не связывается с указанной второй колонкой для аффинной хроматографии.
- 10