

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202293381 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.01.24

(22) Дата подачи заявки  
2021.05.20

(51) Int. Cl. A61P 35/00 (2006.01)  
A61P 37/02 (2006.01)  
C07K 16/12 (2006.01)  
C07K 16/26 (2006.01)  
C07K 16/36 (2006.01)  
C07K 16/46 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ И СРЕДСТВА ПОЛУЧЕНИЯ Ig-ПОДОБНЫХ МОЛЕКУЛ

(31) 20175903.2

(32) 2020.05.21

(33) EP

(86) PCT/NL2021/050322

(87) WO 2021/235936 2021.11.25

(71) Заявитель:  
МЕРУС Н.В. (NL)

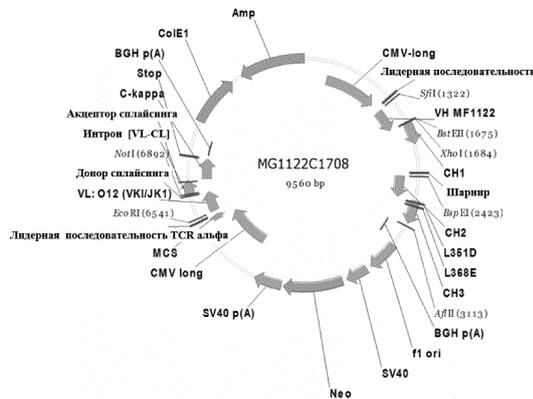
(72) Изобретатель:

Де Крёйф Корнелис, Хендрикс Линда  
(NL)

(74) Представитель:

Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,  
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов  
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,  
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Изобретение относится к гетеродимерным белкам, которые можно использовать для лечения человека, способам их получения и отбора.



202293381 A1

A1 202293381

## СПОСОБЫ И СРЕДСТВА ПОЛУЧЕНИЯ Ig-ПОДОБНЫХ МОЛЕКУЛ

5 Настоящее изобретение относится к областям молекулярной биологии, медицины и биологической терапии. Это особенно относится к области терапевтических антител для лечения различных заболеваний.

### Предшествующий уровень техники

10 В течение последнего десятилетия в качестве альтернативы использованию комбинаций двух антител появились биспецифические антитела. Точно так же поливалентные мультимеры, способные связывать три или более одинаковых или разных антигенов или эпитопов, появились как развивающаяся область технологии. В то время как комбинация двух антител представляет собой смесь двух разных иммуноглобулинов, которые связываются с разными эпитопами на 15 одной и той же или на разных мишенях, в биспецифическом антителе это достигается за счет одного иммуноглобулина. В поливалентном мультимере может быть достигнуто связывание с тремя или более различными эпитопами на одних и тех же или разных мишенях.

20 Связываясь с двумя эпитопами на одних и тех же или разных мишенях, биспецифические антитела могут иметь сходные или превосходящие эффекты по сравнению с комбинацией двух антител, связывающихся с одними и теми же эпитопами. Это также может относиться к получению поливалентных мультимеров, способных связывать три или более мишеней. Кроме того, поскольку биспецифические антитела формата IgG объединяют две разные 25 моновалентные связывающие области в одной молекуле и смеси двух антител IgG объединяют две разные двухвалентные связывающие молекулы в одном препарате, а поливалентные мультимеры могут сочетать три или более связывающих областей, разные эффекты этих форматы также были отмечены. С технологической и регулирующей точки зрения, если эти биспецифические или 30 поливалентные мультимеры могут быть эффективно получены и разделены по существу чистым способом, это делает разработку одного биспецифического антитела или поливалентного мультимера менее сложной, поскольку производство, доклинические и клинические испытания включают единственную молекулу. Таким образом, терапии, основанной на одном

биспецифическом антителе или поливалентном мультимере, способствуют менее сложному и рентабельному процессу разработки лекарств, обеспечивая при этом более эффективную терапию антителами.

Биспецифические антитела на основе формата IgG, состоящие из двух  
5 тяжелых и двух легких цепей, получают различными способами. Например, биспецифические антитела могут быть получены путем слияния двух клеточных линий, секретирующих антитела, для создания новой клеточной линии или путем экспрессии двух антител в одной клетке с использованием технологии рекомбинантной ДНК. Эти подходы дают множество видов антител, поскольку  
10 соответствующие тяжелые цепи каждого антитела могут образовывать моноспецифические димеры (также называемые гомодимерами), которые содержат две идентичные пары тяжелых цепей с одинаковой специфичностью, и биспецифические димеры (также называемые гетеродимерами), которые содержат две разные пары тяжелых цепей с разной специфичностью, а  
15 неспаренные тяжелые или легкие цепи, называемые полутелами, могут давать смесь клеточных продуктов. Кроме того, легкие цепи и тяжелые цепи каждого антитела могут случайным образом соединяться друг с другом с образованием нефункциональных комбинаций. Эту проблему, известную как неправильное спаривание тяжелых и легких цепей, можно решить путем выбора антител,  
20 которые имеют общую легкую цепь, для экспрессии в качестве биспецифических. Ранее заявители продемонстрировали возможность получения поливалентного мультимера, включающего три или более тяжелых и три или более легких цепей, где либо тяжелая, либо легкая, но предпочтительно легкая цепь, является обычной цепью.

Но даже при использовании обычной легкой цепи экспрессия двух или  
25 более тяжелых цепей, содержащих вариации, управляющие образованием гетеродимера, и одной обычной легкой цепи в одной клетке может привести к трем различным видам антител и примесям полутел. Экспрессия тяжелых цепей, имеющих сконструированные вариации остатков в Fc, может способствовать  
30 образованию гетеродимера, но все же может генерировать остаточные полутела, гомодимеры или генерировать гетеродимеры, которые имеют более низкую стабильность из-за сконструированных вариаций. Экспрессия биспецифического антитела может по-прежнему приводить к экспрессии двух моноспецифических «родительских» антител и биспецифического антитела, содержащего

совпадающие Fc-участки. Чем больше сформировано полутел и/или моноспецифических антител, тем ниже общая эффективность системы клеточной экспрессии, и потенциально более дорогостоящие и трудоемкие процессы необходимы для выделения представляющего интерес биспецифического или поливалентного мультимера. Соответственно, если желателен продукт с одним биспецифическим или поливалентным мультимером, нужно выделить интересующее биспецифическое антитело или поливалентный мультимер из полученной смеси.

Необходимость выделения биспецифического антитела или поливалентного мультимера важна в контексте доклинического, клинического и коммерческого производства. Хотя применялись технологии для дальнейшего увеличения процента биспецифических антител в смесях исходных и биспецифических антител и для снижения процента неправильно спаренных тяжелых и легких цепей, остается потребность в биспецифических форматах и многовалентных мультимерных форматах, которые устраняют или минимизируют некоторые из недостатков, отмеченных выше, и которые увеличивают количество продуцируемого целевого фрагмента. Хотя ранее в данной области техники были описаны способы увеличения процента гетеродимерного спаривания биспецифического или поливалентного мультимера, в смеси продуктов экспрессии могут оставаться нежелательные примеси. Кроме того, выделение продукта гетеродимеризации, который представляет собой биспецифическое антитело или поливалентный мультимер, может быть сложным, менее эффективным или более дорогостоящим, в зависимости от способа выделения и состава представляющего интерес фрагмента-мишени.

Таким образом, сохраняется потребность в улучшенных и/или альтернативных технологиях производства и очистки биологических терапевтических средств.

#### Краткое описание настоящего изобретения

В настоящем изобретении предусматривают новые средства для получения и очистки биологических терапевтических средств, такие как Ig-подобные молекулы, биспецифические антитела и поливалентные мультимеры. Также предусматривают новые средства для улучшения взаимодействия по меньшей мере между двумя представляющими интерес доменами СН3, например, когда

несколько доменов СНЗ присутствуют в смеси, вырабатываемой одной клеткой (см., например, WO2013157954 и WO2013157953).

В настоящем изобретении предусматривают выделенный гетеродимерный белок, содержащий первый полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, и  
5 второй полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, где указанный первый полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, содержит варианты аминокислот L351D и L368E, и указанный второй полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, содержащий вариант аминокислоты T366K и L351K, причем первый полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, содержит дополнительный вариант  
10 аминокислоты в положениях S364, K409 и/или K360.

Соответственно, аминокислота 364 может быть валином, изолейцином, треонином, глутамином или лейцином.

Соответственно, аминокислота 409 может быть изолейцином, лейцином или глутаматом.

15 Соответственно, аминокислота 360 может быть аспартатом.

Соответственно, гетеродимерный белок может содержать СНЗ-область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

Соответственно, гетеродимерный белок может содержать Fc-область иммуноглобулина человека. Необязательно Fc-область иммуноглобулина  
20 человека может содержать Fc-область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Соответственно, первый СНЗ-содержащий полипептид может представлять собой тяжелую цепь антитела.

Соответственно, второй СНЗ-содержащий полипептид может представлять собой тяжелую цепь антитела.

25 Соответственно, гетеродимерный белок может дополнительно содержать одну или несколько легких цепей антитела.

Соответственно, гетеродимерный белок может дополнительно содержать одну или несколько легких цепей антитела.

30 Соответственно, легкая цепь антитела может представлять собой обычную легкую цепь антитела.

Также в настоящем изобретении предусматривают фармацевтическую композицию, содержащую выделенный гетеродимерный белок.

Также предусматривают выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую первый и второй СНЗ-содержащие IgG полипептиды человека, описанные в настоящем изобретении.

5 Также предусматривают рекомбинантную клетку-хозяина, содержащую выделенную нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем изобретении.

10 Также предложен способ получения выделенного гетеродимерного белка, описанного в настоящем изобретении, включающий культивирование рекомбинантной клетки-хозяина по настоящему изобретению в условиях, которые обеспечивают экспрессию первого и второго СНЗ-содержащих полипептидов IgG человека.

15 Также предложен способ улучшения стабильности гетеродимерного белка, который содержит первый полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, который включает варианты аминокислот L351D и L368E, и второй полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, который содержит варианты аминокислот T366K и L351K, способ включает введение вариантов аминокислот в первый полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, в положения S364, K409 и/или K360.

20 Также предложен способ снижения стабильности гомодимерного белка, который содержит первый полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, который содержит варианты аминокислот L351D и L368E, причем способ включает введение варианта аминокислоты в первый полипептид, содержащий СНЗ IgG человека в положении S364, K409 и/или K360.

25 Также предложен способ повышения выхода гетеродимерного белка, содержащего первый СНЗ-содержащий полипептид IgG человека и второй СНЗ-содержащий IgG полипептид человека, где указанный первый СНЗ-содержащий полипептид IgG человека содержит варианты аминокислот L351D и L368E и указанный второй СНЗ-содержащий IgG полипептид человека содержит аминокислотные варианты T366K и L351K, включающий введение аминокислотного варианта в первый СНЗ-содержащий полипептид IgG человека в положениях S364, K409 и/или K360.

30 Также предложен способ повышения чистоты гетеродимерного белка, содержащего первый СНЗ-содержащий полипептид IgG человека и второй СНЗ-содержащий IgG полипептид человека, где указанный первый СНЗ-содержащий полипептид IgG человека содержит варианты аминокислот L351D и L368E и

указанный второй СНЗ-содержащий полипептид IgG человека содержит варианты аминокислот Т366К и L351К, включающий (а) введение варианта аминокислоты в первый СНЗ-содержащий полипептид IgG человека в положениях S364, K409 и/или K360; и (б) обработку гетеродимерного белка ионообменной хроматографией.

Соответственно, ионообменная хроматография может быть катионообменной хроматографией.

Соответственно, аминокислота 364 может представлять собой валин, изолейцин, треонин, глутамин или лейцин.

Соответственно, аминокислота 409 может представлять собой изолейцин, лейцин или глутамат.

Соответственно, аминокислота из 360 может представлять собой аспарат.

Соответственно, гетеродимерный белок может содержать СНЗ-область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Соответственно, гетеродимерный белок может содержать Fc-область иммуноглобулина человека. Необязательно Fc-область иммуноглобулина человека может содержать Fc-область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Соответственно, первый СНЗ-содержащий полипептид может представлять собой тяжелую цепь антитела.

Соответственно, второй СНЗ-содержащий полипептид может представлять собой тяжелую цепь антитела.

Соответственно, гетеродимерный белок может дополнительно содержать одну или несколько легких цепей антитела.

Соответственно, легкая цепь антитела может представлять собой обычную легкую цепь антитела.

В настоящем изобретении также предусматривают гетеродимерный белок, полученный способом по настоящему изобретению.

В описании и формуле настоящего изобретения слова «включать» и «содержать» и их варианты означают «включая, но не ограничиваясь этим», то есть они не исключают другие фрагменты, добавки, компоненты, целые числа или стадии.

В описании и формуле настоящего изобретения при употреблении единственного числа подразумевается, что возможно множественное число, если в контекст не указано иное. В частности, когда используют неопределенный

артикуль, определение следует понимать как рассматриваемое множественность, так и единичный объект.

Признаки, целые числа, характеристики, соединения, химические фрагменты или группы, описанные в связи с конкретным объектом, вариантом осуществления или примером настоящего изобретения, следует понимать как применимые к любому другому объекту, варианту осуществления или примеру, описанным в настоящем изобретении, если только они не являются несовместимыми.

Различные объекты настоящего изобретения более подробно описаны ниже.

#### 10 Краткое описание фигур

Для последующего обсуждения, когда за буквой следует число, это указывает на аминокислоту в положении номера остатка в первичной аминокислотной последовательности в соответствии с нумерацией ЕС, например, K351 обозначает лизин в положении 351. Если за буквой следует число, за которым следует еще одна буква, это указывает на аминокислоту в нативном положении (например, Fc человека дикого типа) остатка в соответствии с нумерацией ЕС, и остаток, который сконструирован в этом положении (например, K409S, означает, что лизин присутствует в Fc дикого типа в положении 409, сконструированная вариация является серином).

20 Варианты осуществления настоящего изобретения далее описаны со ссылкой на прилагаемые ниже фигуры.

Фигура 1. Карта вектора, используемого для экспрессии вариантов тяжелой цепи.

25 Фигура 2. Результаты SDS-PAGE для единичной (А) или двойной (Б) трансфекции вариантов K360. Размеры полос, видимые на электрофорезе в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) в невосстанавливающих условиях, соответствуют: 150 кДа (IgG); 75 кДа (полутела); 50 кДа (тяжелая цепь) и 25 кДа (легкая цепь).

30 Фигура 3. Результаты SDS-PAGE для единичной (А) или двойной (Б) трансфекции вариантов S364. Размеры полос, видимые на электрофорезе в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) в невосстанавливающих условиях, соответствуют: 150 кДа (IgG); 75 кДа (полутела); 50 кДа (тяжелая цепь) и 25 кДа (легкая цепь).

Фигура 4. Результаты SDS-PAGE для единичной (А) или двойной (Б) трансфекции вариантов К409. Размеры полос, видимые на электрофорезе в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) в не восстанавливающих условиях, соответствуют: 150 кДа (IgG); 75 кДа (полутела); 50 кДа (тяжелая цепь) и 25 кДа (легкая цепь).

Патентная, научная и техническая литература, на которую делается ссылка в настоящем описании, предоставляет знания, которые были доступны специалистам в данной области техники на момент подачи заявки. Полное раскрытие выданных патентов, опубликованных и находящихся на рассмотрении патентных заявок и других публикаций, которые цитируются в настоящем изобретении, включены в него в качестве ссылки. В случае каких-либо несоответствий настоящее описание будет иметь преимущественную силу.

Различные объекты настоящего изобретения подробнее описаны ниже.

#### Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение предусматривает способы получения гетеродимерных полипептидов, таких как биспецифические антитела или поливалентные мультимеры. Оно также обеспечивает улучшенные способы получения гетеродимерных молекул из смеси полипептидов домена СНЗ, полученных из одной клетки. Соответствующие гетеродимерные белки, композиции, нуклеиновые кислоты и клетки-хозяева также представлены в настоящем описании. Изобретение позволяет получать преимущественно (а в некоторых вариантах осуществления почти исключительно) гетеродимерные полипептиды, имеющие высокие выходы, и уменьшать количество нежелательных видов, таких как полутела или гомодимеры. Способы по настоящему изобретению повышают стабильность гетеродимера и уменьшают образование гомодимера на основе вариаций на поверхности раздела СНЗ гетеродимерного полипептида. Подробности способов и композиций представлены в настоящем описании.

Термины «гетеродимер», «гетеродимерный комплекс» или «гетеродимерная молекула» используют в настоящем изобретении взаимозаменяемо для обозначения молекулы, содержащей по меньшей мере первый полипептид и второй полипептид, где второй полипептид отличается по аминокислотной последовательности от первого полипептида хотя бы на один аминокислотный остаток. Гетеродимер может включать «гетеродимер», образованный первым и

вторым полипептидом, или может образовывать третичные структуры более высокого порядка, в которых присутствуют полипептиды в дополнение к первому и второму полипептиду.

5 За исключением случаев, когда в контексте указано иное, термины «первый» полипептид и «второй» полипептид и их варианты являются просто общими идентификаторами и не должны восприниматься как идентифицирующие конкретный или определенный полипептид или компонент гетеродимеров по настоящему изобретению.

10 В данной области техники описаны различные подходы к стимуляции образования определенного представляющего интерес антитела, тем самым снижая содержание нежелательных антител или побочных продуктов в полученной смеси.

Для антител известно, что взаимодействие СНЗ-СНЗ является основным фактором димеризации Fc (Ellerson J.R. С соавт., *J. Immunol*, 1976, (116) 510-517; Deisenhofer, *J. biochemistry*, 1981, (20) 2361-2370). Кроме того, хорошо известно, что когда два домена СНЗ взаимодействуют друг с другом, они встречаются на поверхности раздела белок-белок, которая содержит «контактные» остатки (также называемые контактными аминокислотами, остатками интерфейса или аминокислотами интерфейса). Контактные аминокислоты первого домена СНЗ взаимодействуют с одной или несколькими контактными аминокислотами второго домена СНЗ. Контактные аминокислоты обычно находятся в пределах 5,5 Å (предпочтительно в пределах 4,5 Å) друг от друга в трехмерной структуре антитела. Взаимодействие между контактными остатками из одного домена СНЗ и контактными остатками из другого домена СНЗ может, например, осуществляться посредством сил Ван-дер-Ваальса, водородных связей, опосредованных водой водородных связей, солевых мостиков или других электростатических сил, взаимодействий притяжения между ароматическими боковыми цепями, дисульфидных связей или других сил, известных специалистам в данной области. Ранее было показано, что примерно одна треть боковых цепей контактных аминокислот на границе СНЗ-домена IgG1 человека может отвечать за большую часть вклада в сворачивание и ассоциацию домена. Кроме того, можно предположить, что другие (соседние) аминокислотные остатки могут влиять на взаимодействие на границе белок-белок.

15  
20  
25  
30

В данной области применялись подходы для вмешательства в димеризацию тяжелых цепей антител. В данной области описан ряд способов конструирования доменов СНЗ, способствующих гетеродимеризации, а не гомодимеризации.

5 Подход к производству данного представляющего интерес биспецифического антитела основан на электростатической инженерии контактных остатков в пределах интерфейса СНЗ-СНЗ.

Например, подход к получению данного представляющего интерес биспецифического антитела или поливалентного мультимера, основанный на электростатической инженерии контактных остатков на поверхности раздела 10 СНЗ-СНЗ, описан в US 9248182, US 9358286, US 9248182 и US 9758805.

Используя комбинированное вычислительное моделирование и итеративную экспериментальную стратегию идентификации новой парной конструкции заряд-заряд, названной «ДЕКК», контактные остатки были идентифицированы путем введения измененной полярности заряда для поддержки электростатических 15 взаимодействий, которые способствуют образованию гетеродимера, при одновременном снижении гомодимеризации за счет отталкивания зарядов. В частности, пара L351D/T366K приводит к эффективному образованию гетеродимеров и очень небольшого количества гомодимеров. Дальнейший вычислительный анализ использован для введения дополнительных 20 электростатических взаимодействий в сердцевину гетеродимерного интерфейса СНЗ, в результате чего получены варианты L351D, L368E/L351K, T366K или ДЕКК, которые показали образование гетеродимера с высоким выходом. Кроме того, уровень агрегации, развертывания и периода полураспада *in vivo* был аналогичен уровню природных антител. Структурный анализ биспецифических 25 антител ДЕКК выявил неожиданные взаимодействия. Как и предсказывало компьютерное моделирование, остатки Asp-351 и Glu-368 взаимодействуют с остатком Lys-366 в противоположном домене СНЗ. Однако в результате локальных сдвигов в каркасе IgG, образующих стабилизирующие взаимодействия солевой мостик, остаток Lys-351 не взаимодействовал с Asp- 30 351, как предполагалось, но образовывал взаимодействия с остатками Pro-352, Ser-354 и Glu-357. По этим взаимодействиям можно рассчитать стабильность гетеродимерной молекулы, что делает эту платформу очень привлекательной для разработки новых биспецифических антител.

Настоящее изобретение основано на гетеродимерных биспецифических или поливалентных мультимерах, содержащих варианты аминокислотные остатки в пределах интерфейса СНЗ биспецифического или поливалентного мультимера, которые можно использовать в сочетании с ранее описанными вариантами

5 аминокислотными остатками DEKK или с другими средствами усиления гетеродимеризации, описанными ранее в данной области техники, такими как «выступ-во-впадину» или инженерия заряда Fc (домены СН2 и/или СНЗ).

Например, используя вышеупомянутую технологию DEKK и включая в тяжелую цепь, содержащую вариант DE, дополнительные варианты аминокислотных

10 остатков в положениях K360, S364 и/или K409, можно дополнительно улучшить эффективность, с помощью которой формируются гетеродимерные пары по сравнению с гомодимерными парами (например, парой DEDE СНЗ).

Кроме того, в условиях сверхэкспрессии одного из двух плечей тяжелой цепи, которые содержат требуемый гетеродимер, это может привести к

15 выработке гомодимеров такого плеча. Например, в зависимости от условий, в которых используется инженерия гетеродимеров DEKK, сверхэкспрессия цепи DE по отношению к количеству цепи КК может потенциально генерировать гомодимеры DEDE. Использование вариантов в положениях K360, S364 и/или K409 (как описано в настоящем изобретении) допускает дестабилизацию

20 гомодимера, образуя полутела или одиночные плечи тяжелой цепи (например, предпочтительнее цепи DE, а не гомодимеры DEDE), что обеспечивает более простые и эффективные стадии очистки, и которые, когда они присутствуют в смеси с биспецифическим антителом или поливалентным мультимером, вызывают меньше помех при тестировании этих молекул.

Кроме того, получение полутел предпочтительнее, чем гомодимеров, поскольку их легче отделить в партиях белков, используемых для исследований, с помощью гель-фильтрации, в отличие от гомодимеров, которые могут быть неотделимы или их труднее отделить от гетеродимеров при такой фильтрации. Кроме того, полутела, как правило, имеют большее разделение пиков на

30 катионообменной хроматографии (СІЕХ) чем гетеродимеры по сравнению с гомодимером и пиками гетеродимера, делая выбор удержания, связанного с чистым биспецифическим или поливалентным мультимером, легче.

Другой особенностью одного или нескольких вариантов аминокислот, описанных в настоящем изобретении, является то, что такая вариация

способствует образованию гетеродимера, стабильности и/или дестабилизации гомодимеров, тем самым повышая общую эффективность системы экспрессии.

В одном объекте настоящего изобретения предусматривают способ получения гетеродимерной молекулы (например, биспецифического антитела или поливалентного мультимера), включающей два домена СНЗ, где один домен СНЗ содержит остаток (остатки) варианта СНЗ в положениях К360, S364 и /или К409, причем указанный способ обеспечивает в клетке-хозяине:

первую нуклеиновую кислоту, кодирующую 1-ю полипептидную цепь, содержащую домен СНЗ, и

вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую 2-ю полипептидную цепь, содержащую домен СНЗ,

где первая нуклеиновая кислота кодирует один или более вариантов остатка (остатков) домена СНЗ в положениях К360, S364 и/или К409; указанный способ дополнительно включает стадию культивирования указанной клетки-хозяина и обеспечения экспрессии указанных двух нуклеиновых кислот и выделения указанной гетеродимерной молекулы из культуры.

В одном объекте настоящего изобретения предусматривают способ получения гетеродимерной молекулы (например, биспецифического антитела или поливалентного мультимера), включающей по меньшей мере две разные Ig-подобные молекулы из одной клетки-хозяина, где каждая из указанных двух Ig-подобных молекул содержит два домена СНЗ, которые способны образовывать поверхность раздела, и где домен СНЗ каждой гетеродимерной молекулы содержит один или несколько вариантов остатков домена СНЗ в положениях К360, S364 и/или К409, причем указанный способ обеспечивает в клетке-хозяине:

а) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую 1-ю полипептидную цепь, содержащую домен СНЗ,

б) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую 2-ю полипептидную цепь, содержащую домен СНЗ,

в) третью нуклеиновую кислоту, кодирующую 3-ю полипептидную цепь, содержащую домен СНЗ, и

г) четвертую нуклеиновую кислоту, кодирующую 4-ю полипептидную цепь, содержащую домен СНЗ,

причем по меньшей мере две из указанных нуклеиновых кислот снабжены средствами для предпочтительного спаривания указанных 1-го и 2-го полипептидов, содержащих домен СНЗ, и указанных 3-го и 4-го доменов СНЗ, где указанная нуклеиновая кислота, кодирующая указанный 1-й домен СНЗ, содержит один или более из остатков варианта домена СНЗ в положениях К360, S364 и/или К409, и указанная нуклеиновая кислота, кодирующая указанный 3-й домен СНЗ, содержит один или несколько остатков варианта домена СНЗ в положениях К360, S364 и/или К409, причем указанный способ дополнительно включает этап культивирования указанной клетки-хозяина и обеспечения экспрессии указанных по меньшей мере четырех нуклеиновых кислот и выделения указанных по меньшей мере двух различных Ig-подобных молекул из культуры.

Другой объект согласно указанному выше изобретению обладает указанными средствами предпочтительного спаривания указанных полипептидов, содержащих 1-й и 2-й домен СНЗ, отличается по средствам предпочтительного спаривания указанных 3-го и 4-го доменов СНЗ.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают первую нуклеиновую кислоту, кодирующую 1-ю полипептидную цепь, содержащую домен СНЗ, дополнительно содержащую DE в положениях 351 и 368, соответственно, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую 2-ю содержащую домен СНЗ полипептидную цепь, содержащую а КК в положениях 351 и 366, где указанный один или несколько вариантных остатков домена СНЗ в положениях К360, S364 и/или К409 присутствуют в 1-й полипептидной цепи, содержащей домен СНЗ, дополнительно содержащей DE в положениях 351 и 368.

В другом объекте настоящего изобретения предусматривают первую нуклеиновую кислоту, кодирующую 1-ю полипептидную цепь, содержащую домен СНЗ, содержащую варианты, которые облегчают гетеродимеризацию со 2-й полипептидной цепью, содержащей домен СНЗ, кодируемую второй нуклеиновой кислотой, содержащей комплементарные вариации, которые облегчают гетеродимеризацию, причем указанная первая нуклеиновая кислота дополнительно кодирует один или несколько вариантных остатков домена СНЗ (в положениях К360, S364 и/или К409).

Понятие «катионообменная смола» относится к твердой фазе, которая отрицательно заряжена и имеет свободные катионы для обмена с катионами в

водном растворе, пропускаемом над твердой фазой или через нее. Заряд может быть обеспечен путем присоединения одного или нескольких заряженных лигандов к твердой фазе, например, путем ковалентной связи. В другом варианте или дополнительно заряд может быть неотъемлемым свойством твердой фазы (например, как в случае силикагеля, который имеет общий отрицательный заряд).

В контексте настоящего изобретения термин «белок клетки-хозяина (БКХ)» означает белок, отличный от рекомбинантного клеточного продукта, такой как гетеродимерный полипептид (например, биспецифическое антитело или поливалентный мультимер), который представляет собой белок, полученный из источника по выработке антител, то есть клетки-хозяина. Для биспецифического антитела, которое можно использовать в качестве терапевтического средства, БКХ предпочтительно отделяют из исходного агента. Используемое в настоящем изобретении выражение «удаленный белок клетки-хозяина» включает все примеси, за исключением целевого продукта или молекулы-мишени, например, биспецифического антитела или поливалентного мультимера, подлежащих очистке, в том числе, помимо самого белка клетки-хозяина, ДНК и факторы роста клеток, полученные из клеток-хозяев. Таким образом, при удалении белка клетки-хозяина чистота молекулы-мишени может быть значительно повышена.

Часто желательно получить более одного гетеродимерного белка, например, для того, чтобы более эффективно вмешиваться во множественные биологические пути, участвующие в патологическом процессе, или в инвазии, репликации и/или распространении патогена.

Смесь более чем одного гетеродимерного белка также особенно полезна для лечения некоторых заболеваний. Например, опухолевые клетки используют множество различных стратегий для развития устойчивости во время лечения антителами или низкомолекулярными препаратами. Резистентность может включать много рецепторов на клеточной поверхности и растворимых молекул, и считается полезной разработка методов лечения рака на основе антител, которые одновременно воздействуют на несколько таких механизмов, связанных с заболеванием и ускользанием. В случае задействования более двух таких механизмов, связанных с заболеванием и ускользанием от лечения, биспецифический, поливалентный мультимер или смесь гетеродимерных белков могут обеспечить инновационный и привлекательный терапевтический формат.

Предпочтительно такие смеси гетеродимерных белков вырабатываются одной клеткой для облегчения процесса разработки лекарств, который является менее сложным с точки зрения регулирования и рентабельным и осуществимым с точки зрения производства лекарств и клинической разработки. При  
5 одноклеточном подходе желательно использовать способы, которые обеспечивают контролируемую и эффективную выработку биспецифических антител, тем самым уменьшая или даже полностью отменяя необходимость отделения желаемой смеси биспецифических полипептидов IgG от  
10 нежелательных моноспецифических полипептидов IgG. В предшествующем уровне техники смеси моноспецифических и биспецифических антител вырабатывалась одной клеткой (WO 2004/009618), но эти смеси представляют собой сложные смеси нескольких различных видов биспецифических и моноспецифических антител. Еще одной задачей настоящего изобретения является обеспечение средств и способов получения определенных смесей  
15 гетеродимерных белков (например, биспецифических антител) в отдельных клетках. Предпочтительно разрабатываются способы, которые приводят к получению смесей (биспецифических) антител с долей не менее 95%, не менее 97% или даже более 99% димерных полипептидов IgG, независимо от количества мономерных побочных продуктов, описываемых ниже. Как правило,  
20 в клетке, где вырабатывается множество интактных полипептидов IgG, могут присутствовать полуполипептиды (мономерные побочные продукты), которые можно просто удалить с помощью эксклюзионной хроматографии, известной в данной области.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает  
25 способы получения определенного гетеродимерного полипептида (например, биспецифического антитела или поливалентного мультимера) или смеси по меньшей мере двух различных Ig-подобных молекул в отдельных клетках вместо одного (биспецифического) представляющего интерес антитела, причем образование других нежелательных видов димерных антител снижено или даже  
30 отсутствует, предпочтительно в контексте использования высокопроизводительного скрининга продукта экспрессии, где использование очистки СЕХ нецелесообразно, а присутствие гомодимеров, в отличие от полутел, может значительно нарушить экспериментальные протоколы и исказить экспериментальные результаты. Уменьшение или устранение гомодимеров

достигается путем введения вариантов на границе раздела СНЗ (в положениях К360, S364 и/или К409), которые усиливают отталкивание сходных доменов СНЗ и могут увеличивать силы притяжения отличающихся доменов СНЗ.

Такие варианты могут быть введены в цепь DE при использовании  
5 технологии DEKK СНЗ. В другом варианте осуществления настоящего изобретения такие варианты могут быть введены другими технологиями гетеродимеризации, которые облегчают предпочтительное спаривание различных тяжелых цепей (образование гетеродимера) по сравнению с соединением идентичных тяжелых цепей (образование гомодимера), например,  
10 такими как выступ-во-впадину или конструирование заряда Fc (например, домен СН2 и/или СНЗ). Полученная смесь хорошо обозначена, и ее состав контролируется конструкцией вариантов домена СНЗ.

Кроме того, регулирование уровней экспрессии и/или различных долей трансфекции, используемых для экспрессии, влияет на состав смеси. В способе  
15 согласно настоящему изобретению первая нуклеиновая кислота кодирует домен СНЗ, который предпочтительно спаривается с доменом СНЗ, кодируемым второй нуклеиновой кислотой, или первая нуклеиновая кислота кодирует домен СНЗ, который предпочтительно спаривается с доменом СНЗ, кодируемым второй нуклеиновой кислотой и третья нуклеиновая кислота кодируют домен СНЗ,  
20 который предпочтительно спаривается с доменом СНЗ, кодируемым четвертой нуклеиновой кислотой. Настоящее изобретение также предусматривает смеси по меньшей мере двух различных Ig-подобных молекул, которые можно получить способами по настоящему изобретению.

В настоящем изобретении определение «предпочтительная пара указанных  
25 1-го и 2-го полипептидов, содержащих СНЗ-домен», означает, что получаемые димеры, содержащие 1-й полипептид, включающий СНЗ-домен, и/или 2-й полипептид, включающий СНЗ-домен, будут димерами, состоящими из 1-го полипептида, включающего СНЗ-домен, спаренного с одним 2-м полипептидом, включающим СНЗ-домен, с ограниченным образованием димеров, содержащих  
30 1-й полипептид, включающий СНЗ-домен, спаренный с другим 1-м полипептидом, включающим СНЗ-домен, и 2-м полипептидом, включающим СНЗ-домен, спаренный с другим 2-м полипептидом, включающим СНЗ-домен. Аналогичным образом, определение «предпочтительная пара указанных 3-го и 4-го полипептидов, содержащих СНЗ-домен», означает, что получаемые димеры,

содержащие 3-й полипептид, включающий СНЗ-домен, и/или 4-й полипептид, включающий СНЗ-домен, будут димерами, состоящими из одного 3-го полипептида, включающего СНЗ-домен, спаренного с одним 4-м полипептидом, включающим СНЗ-домен, с ограниченным образованием димеров, содержащих

5 3-й полипептид, включающий СНЗ-домен, спаренный с другим 3-м полипептидом, включающим СНЗ-домен, и 4-м полипептидом, включающим СНЗ-домен, спаренный с другим 4-м полипептидом, включающим СНЗ-домен. В результате, когда нуклеиновые кислоты, кодирующие четыре разных (А, В, С, D) полипептида, содержащих домен СНЗ, вводят в одну клетку вместо смеси 10

10 различных Ig-подобных димеров (AA, AB, AC, AD, BB, BC, BD, CC, CD и DD) образуется смесь преимущественно двух биспецифических Ig-подобных молекул. Рядовому специалисту, использующему изложенные здесь варианты, известно, что с помощью этой технологии также могут быть созданы другие необходимые комбинации.

15 В способе по настоящему изобретению каждая из описанных выше полипептидных цепей, содержащих домен СНЗ, предпочтительно дополнительно содержит переменную область, узнающую целевой эпитоп, или две или более переменных областей. Переменные области, которые являются частью полипептидных цепей, содержащих домен СНЗ, соединены с обычной легкой

20 цепью. В этом случае различаются только VH переменных областей, тогда как VL во всех переменных областях по существу одинаковы. Следовательно, один из объектов представляет способ по настоящему изобретению, который дополнительно включает обеспечение указанной клетки-хозяина нуклеиновой кислотой, кодирующей общую легкую цепь. В одном варианте осуществления

25 настоящего изобретения каждая переменная область полипептидных цепей, содержащих домен СНЗ, распознает отличающийся целевой эпитоп. В одном варианте осуществления настоящего изобретения каждая из указанных 4 переменных областей 4 полипептидных цепей, содержащих домен СНЗ, распознает другой целевой эпитоп. Например, если первая нуклеиновая кислота

30 кодирует тяжелую цепь, которая дополнительно содержит переменный домен со специфичностью к антигену А, вторая нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь, которая дополнительно содержит переменный домен со специфичностью к антигену В, третья нуклеиновая кислота кодирует тяжелая цепь, которая дополнительно содержит переменный домен со специфичностью

к антигену С, и четвертая нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь, которая дополнительно содержит вариабельный домен со специфичностью к антигену D, тогда будет получена смесь, содержащая биспецифические Ig-подобные молекулы, которые специфичны для АВ и биспецифических Ig-подобных молекул, специфичных для CD. Образование моноспецифических антител (со специфичностью к АА, ВВ, СС или DD) или биспецифических антител со специфичностью к АС, AD, ВС или BD снижено или даже отсутствует благодаря средствам предпочтительного спаривания указанных 1-го и 2-го полипептидов, содержащих домены СНЗ, и указанных 3-го и 4-го полипептидов, содержащих домен СНЗ. Это происходит, когда используется другая технология гетеродимеризации указанных 1-го и 2-го полипептидов, содержащих СНЗ-домены, и указанных 3-го и 4-го полипептидов, содержащих СНЗ-домены. Конечно, также возможно использовать дополнительные нуклеиновые кислоты, например, кодирующие 5-й и 6-й полипептиды, содержащие домен СНЗ, для получения определенных смесей, содержащих более двух разных Ig-подобных молекул (например, АВ и CD).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения указанные тяжелые цепи, содержащие вариабельный домен со специфичностью к антигенам А и В, могут содержать дополнительный вариабельный домен со специфичностью к антигенам С или D, соединенный через линкер, тем самым образуя поливалентный мультимер, где тяжелые цепи А и В могут димеризоваться по технологии гетеродимеризации, такой как DEKK, и гомодимеры уменьшаются путем включения в одну тяжелую цепь вышеуказанных вариантов, которые дестабилизируют образование гомодимера, создавая полутела.

Следует отметить, что соотношение нуклеиновых кислот, используемых в способе по настоящему изобретению, не обязательно должно быть 1:1:1:1, и соотношение образующихся Ig-подобных молекул, которые экспрессируются, не обязательно должно быть 1:1. Можно использовать средства, известные в данной области техники, для получения смесей антител с оптимизированными соотношениями. Например, уровни экспрессии нуклеиновых кислот и, следовательно, соотношения продуцируемых Ig-подобных молекул можно регулировать с помощью различных генетических элементов, таких как промоторы, энхансеры и репрессоры, или путем контроля сайта геномной

интеграции числа копий конструкций ДНК, кодирующих антитела.

Предпочтительно, количество первого полипептида, содержащего СНЗ IgG человека, в качестве экспрессированного, который содержит аминокислотный вариант L351D и L368E и вариантные остатки в положениях S364, K409 и/или

5 K360, выше, чем количество второго полипептида, содержащего СНЗ IgG человека, который включает варианты аминокислот T366K и L351K.

Предпочтительно отношение массы первого полипептида, содержащего СНЗ IgG человека, ко второму полипептиду, содержащему СНЗ IgG человека, составляет от 1:1 до 10:1. Более предпочтительно количество DE-содержащего полипептида

10 составляет от 1:1 до 5:1, более предпочтительно от 1,1 до 3:1 или от 1:1 до 2:1.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предложен способ по настоящему изобретению, в котором указанные средства предпочтительного спаривания указанных 1-го и 2-го полипептидов, содержащих домены СНЗ, отличаются от указанных средств предпочтительного

15 спаривания указанных 3-го и 4-го полипептидов, содержащих домены СНЗ.

Понятие «отличаются» означает, что средства для предпочтительного спаривания указанных 1-го и 2-го полипептидов, содержащих домены СНЗ, сконструированы таким образом, что предпочтительным является спаривание 1-

20 и 2-й цепей. Конструкция такова, что по существу не будет происходить взаимодействия между 1-й и 3-й и/или между 1-й и 4-й полипептидными цепями, содержащими домены СНЗ. Другими словами, димеризация между указанным 1-

м полипептидом, содержащим домен СНЗ, и указанными 3-м или 4-м полипептидом снижается по существу до нуля, и так далее. 3-й и 4-й

25 полипептиды, содержащие домены СНЗ, могут быть либо дикого типа, либо

могут содержать средства для предпочтительного спаривания, которые отличаются от средств для предпочтительного спаривания 1-го и 2-го доменов СНЗ.

В настоящем изобретении предусматривают способы эффективного и контролируемого получения четко определенной смеси Ig-подобных молекул с

30 высокой долей биспецифических антител в смеси. Даже доля (двух)

биспецифичностей, составляющая по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или более, получается в системе, где желательны две биспецифичности. Это означает, что получают только самое большее 5%, самое большее 3% или менее моноспецифических двухвалентных побочных продуктов. Следует отметить, что

количество мономерных побочных продуктов, полумолекул, менее важно, поскольку эти полумолекулы легко отделяются от димеров за счет разницы в их размерах и, например, не могут сшивать рецепторы. Соответственно, представляемое описание изобретения обеспечивает применение вариантов СНЗ в плечах тяжелой цепи, которые при экспрессии биспецифических антител снижают выработку гомодимеров в пользу полутел, сохраняя при этом стабильность биспецифического антитела, что облегчает очистку биспецифического и снижает гомодимерное вмешательство в высокопроизводительный скрининг и анализ желаемого биспецифического антитела. Предпочтительно варианты по настоящему изобретению, предусмотренные в СНЗ-домене, уменьшают количество гомодимерных побочных продуктов и усиливают образование гетеродимерных целевых молекул, а также уменьшают количество продуцируемых полутел, тем самым повышая общую эффективность системы экспрессии и упрощая последующее отделение целевой молекулы (молекул) от белка клетки-хозяина.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения переменные области 1-й и 2-й полипептидных цепей, содержащих СНЗ-домен, распознают разные целевые эпитопы, тогда как переменные области 3-й и 4-й полипептидных цепей, содержащих СНЗ-домен, распознают одни и те же целевые эпитопы. Это приводит к преимущественной выработке одного вида биспецифической Ig-подобной молекулы и одного вида моноспецифической Ig-подобной молекулы. Например, если переменные области 1-й и 2-й полипептидных цепей, содержащих СНЗ-домен, распознают разные целевые эпитопы и если обе переменные области 3-й и 4-й полипептидных цепей, содержащих СНЗ-домен, распознают один и тот же целевой эпитоп, который отличается от целевых эпитопов, распознаваемых 1-м и 2-м СНЗ-доменами, будет образовываться смесь Ig-подобных молекул, обладающих специфичностью в отношении АВ или СС. Дополнительно предложен способ согласно настоящему изобретению, в котором целевой эпитоп, распознаваемый переменными областями 3-й и 4-й полипептидных цепей, содержащих СНЗ-домен, является одним и тем же, но отличается от целевого эпитопа, распознаваемого переменной областью 1-й или 2-й полипептидной цепи, включающей СНЗ-домен. В другом варианте осуществления настоящего изобретения когда переменные области 1-й и 2-й полипептидных цепей,

содержащих СНЗ-домен, распознают разные целевые эпитопы и когда  
вариабельные области 3-й и 4-й полипептидных цепей, содержащих СНЗ-домен,  
обе распознают один и тот же эпитоп, что и 1-я или 2-я полипептидные цепи,  
содержащие СНЗ-домен, образуется смесь Ig-подобных молекул, обладающих  
5 специфичностью в отношении АВ и АА или АВ и ВВ. В настоящем изобретении  
также предусматривают способ, отличающийся тем, что целевой эпитоп,  
распознаваемый вариабельными областями 3-й и 4-й полипептидных цепей,  
содержащих СНЗ-домен, является таким же, как целевой эпитоп,  
распознаваемый вариабельными областями 1-й или 2-й полипептидных цепей,  
10 включающих СНЗ-домен.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения  
гетеродимерный полипептид по настоящему изобретению представляет собой  
иммуноглобулин-подобный (Ig-подобный) полипептид. Термин «Ig-подобный  
полипептид», используемый в настоящем изобретении, означает белковую часть,  
15 которая содержит по меньшей мере один домен иммуноглобулина (Ig).  
Указанный Ig-подобный полипептид содержит последовательность,  
выполняющую функцию по меньшей мере домена СНЗ иммуноглобулина,  
предпочтительно последовательность содержит домен СНЗ IgG1. Белковые  
фрагменты, которые содержат по меньшей мере домен СНЗ, могут быть  
20 дополнительно снабжены специфическими связывающими фрагментами. СНЗ-  
домены по настоящему изобретению, содержащие средства для  
предпочтительного спаривания, могут, таким образом, использоваться для  
предпочтительного спаривания двух доменов СНЗ, содержащих белковые  
фрагменты, для конструирования желаемых гетеродимерных связывающих  
25 молекул или смесей связывающих молекул. Связывающие фрагменты, которые  
могут быть сконструированы для белковых фрагментов, содержащих СНЗ-  
домен, могут быть любым связывающим агентом, включая, но ими не  
ограничиваясь, одноцепочечные Fv, одноцепочечные или тандемные диатела  
(TandAb®), VHH, Anticalins®, Nanobodies®, BiTE®, Fab, белки с анкириновыми  
30 повторами или DARPINs®, Avimers®, DART, TCR-подобное антитело,  
Adnectins®, Affilins®, Trans-bodies®, Affibodies®, TrimerX®, MicroProteins,  
Fynomers®, Centyrins® или KALBITOR®. В одном варианте осуществления  
настоящего изобретения связывающие фрагменты представляют собой  
вариабельные области антитела (комбинации VH/VL). Вариабельные области,

являющиеся частью СНЗ-содержащих полипептидных цепей, предпочтительно разделяют общую легкую цепь. В этом случае различаются только VH переменных областей, тогда как VL во всех переменных областях по существу одна и та же.

5 В другом варианте осуществления настоящего изобретения, или в дополнении, другие полипептиды могут быть сконструированы для СНЗ доменов по настоящему изобретению, включая цитокины, гормоны, растворимые лиганды, рецепторы и/или пептиды.

10 В одном варианте осуществления настоящего изобретения указанный Ig-подобный полипептид содержит каркас Fc полной длины. В другом варианте осуществления настоящего изобретения Ig-подобными полипептидами являются антитела. Переменные области этих антител предпочтительно имеют общую легкую цепь, но могут отличаться по областям VH. Термин «антитело», используемый в настоящем изобретении, означает белковую молекулу, 15 принадлежащую к классу белков иммуноглобулинов, содержащую один или несколько доменов, которые связывают эпитоп на антигене, где такие домены происходят из переменной области антитела или обладают гомологией последовательности с переменной областью антитела. Антитела известны в данной области и включают несколько изоформ, таких как IgG1, IgG2, IgG3, 20 IgG4, IgA, IgD, IgE и IgM. Антитело по настоящему изобретению может быть любым из этих изоформ, или их функциональным производным, и/или фрагментом. В одном варианте осуществления настоящего изобретения образуются Ig-подобные молекулы, которые представляют собой антитела изоформа IgG, IgA, IgD, IgE или IgE. В одном варианте осуществления настоящего 25 изобретения образуются Ig-подобные молекулы, которые представляют собой антитела изоформа IgG, поскольку антитела IgG, например, имеют более длительный период полужизни по сравнению с антителами других изоформ.

Антитела, полученные способами по настоящему изобретению, могут иметь последовательности любого происхождения, включая последовательности 30 мышей, птиц, например, кур, и человека. Антитела могут состоять из последовательностей только одного происхождения, например, полностью антитела человека, или они могут иметь последовательности, происходящие более чем от одного вида, что приводит, например, к химерным или гуманизированным антителам. Связывание антител может быть выражено с

точки зрения специфичности и аффинности. Специфичность определяет, какой антиген или его эпитоп связывается связывающим доменом. Аффинность представляет собой меру силы связывания с конкретным антигеном или эпитопом. Используемый в настоящем изобретении термин «антиген» означает  
5 вещество или молекулу, которые могут быть связаны антигенсвязывающим участком антитела. Кроме того, смеси антигенов могут рассматриваться как «антигены»; специалисту в данной области техники понятно, что лизат опухолевых клеток или вирусных частиц может быть обозначен как «антиген», тогда как такой лизат опухолевых клеток или препарат вирусных частиц  
10 содержит множество антигенных детерминант. Антиген содержит по меньшей мере один, а часто и несколько эпитопов. Термин «эпитоп», используемый в настоящем изобретении, означает часть антигена, которая распознается иммунной системой, в частности, антителами, В-клетками или Т-клетками.

Термин «домен СН3» хорошо известен в данной области. Структура IgG  
15 состоит из четырех цепей, двух легких и двух тяжелых цепей; каждая легкая цепь имеет два домена, переменную и константную легкую цепь (VL и CL), и каждая тяжелая цепь имеет четыре домена, переменную тяжелую цепь (VH) и три константных домена тяжелой цепи (CH1, CH2, CH3). Область доменов CH2 и CH3 тяжелой цепи называется частью Fc (кристаллизуемый фрагмент), Fc-фрагментом, Fc-каркасом или просто Fc. Молекула IgG представляет собой  
20 гетеротетрамер, имеющий две тяжелые цепи, которые удерживаются вместе дисульфидными связями (-S-S-) в шарнирной области, и две легкие цепи, присоединенные к тяжелым цепям через -S-S-дисульфидные связи. Тяжелые цепи димеризуются, в том числе посредством взаимодействий на границе  
25 раздела доменов CH3-CH3 и посредством взаимодействий в шарнирной области. Число шарнирных дисульфидных связей варьирует в зависимости от подкласса иммуноглобулина (Paradea и Check, 1989). Fc-фрагмент молекулы иммуноглобулина представляет собой димер двух C-концевых константных областей, доменов CH2 и CH3, тяжелой цепи. К числу его физиологических  
30 функций относятся взаимодействия с системой комплемента и со специфическими рецепторами на поверхности различных клеток. Известно, что взаимодействия между доменами CH3 двух отдельных тяжелых цепей играют важную роль в управлении димеризацией тяжелых цепей. Таким образом, домены CH3 направляют ассоциацию тяжелых цепей антитела (Deisenhofer J.,

*Biochemistry*, 1981, 20, 2361-2370; Miller S., *J. Mol. Biol.*, 1990, 216, 965-973; Padlan, *Advances in Protein Chemistry*, 1996, 49, 57-133). Таким образом, варианты СНЗ по настоящему изобретению можно использовать в сочетании с другими доменами антител для получения полноразмерных антител, которые являются либо биспецифичными, либо моноспецифичными. Специфичность антитела, определяемая комбинациями VH/VL, обычно не влияет на осуществление димеризации тяжелой цепи, которое направляется доменами СНЗ.

Контактные остатки на границе раздела СНЗ-СНЗ могут быть либо заряженными аминокислотами, либо аминокислотными остатками, нейтральными в физиологических условиях. Термин «заряженный аминокислотный остаток» или «заряженный остаток», используемый в настоящем изобретении, означает аминокислотные остатки с электрически заряженными боковыми цепями. Это могут быть либо положительно заряженные боковые цепи, такие как аргинин (Arg, R), гистидин (His, H) и лизин (Lys, K), либо отрицательно заряженные боковые цепи, такие как аспарагиновая кислота (Asp, D) и глутаминовая кислота (Glu, E). Термин «нейтральный аминокислотный остаток» или нейтральный остаток, используемый в настоящем изобретении, относится ко всем другим аминокислотам, которые не несут электрически заряженных боковых цепей. Эти нейтральные остатки включают серин (Ser, S), треонин (Thr, T), аспарагин (Asn, N), глутамин (Glu, Q), цистеин (Cys, C), глицин (Gly, G), пролин (Pro, P), аланин (Ala, A), валин (Val, V), изолейцин (Ile, I), лейцин (Leu, L), метионин (Met, M), фенилаланин (Phe, F), тирозин (Tyr, Y) и триптофан (Trp, T).

Термин «граница раздела доменов СНЗ-СНЗ» или «интерфейс СНЗ», «спаривание СНЗ-СНЗ», «интерфейс домена» или просто «интерфейс», используемый в настоящем изобретении, относится к ассоциации между двумя доменами СНЗ отдельных полипептидов, содержащих СНЗ-домены, который является результатом взаимодействия аминокислотных остатков, включая по меньшей мере одно взаимодействие между аминокислотой первого домена СНЗ и аминокислотой второго домена СНЗ. Такое взаимодействие осуществляется, например, посредством сил Ван-дер-Ваальса, водородных связей, опосредованных водой водородных связей, солевых мостиков или других электростатических сил, взаимодействий притяжения между ароматическими

боковыми цепями, образования дисульфидных связей или других сил, известных специалисту в данной области.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу разработки клетки-хозяина для выработки по меньшей мере двух различных Ig-подобных полипептидов, причем способ включает стадию введения в указанную клетку-хозяина последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих по меньшей мере первую и вторую полипептидные цепи, содержащие СНЗ-домен, причем по меньшей мере две из указанных последовательностей нуклеиновых кислот снабжены средствами для предпочтительного спаривания указанных первого и второго полипептидов, содержащих домен СНЗ, при этом указанные последовательности нуклеиновых кислот вводят последовательно или одновременно. Аналогичным образом, клетка-хозяин уже может иметь введенные в указанную клетку-хозяина последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие по меньшей мере первую и вторую СНЗ-содержащие полипептидные цепи, где нуклеиновая кислота, кодирующая переменные области, интегрирована рядом с нуклеиновой кислотой, кодирующей домен СНЗ, таким образом, что клетка-хозяин может быть использована в качестве клетки-хозяина для интеграции различных переменных областей для выработки различных гетеродимерных молекул, причем по меньшей мере две из указанных последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих по меньшей мере первый и второй домен СНЗ, обеспечивают средства для предпочтительного спаривания указанных первого и второго полипептидов, содержащих СНЗ-доменов.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу разработки клетки-хозяина для выработки гетеродимерных полипептидов, причем способ включает стадию введения в указанную клетку-хозяина последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих по меньшей мере первую и вторую полипептидные цепи, содержащие домен СНЗ, где указанная полипептидная цепь, содержащая первый домен СНЗ, содержит положительно заряженный аминокислотный остаток, а СНЗ дикого типа обычно имеет нейтральный аминокислотный остаток в этом положении, и где указанная вторая полипептидная цепь, содержащая домен СНЗ, содержит отрицательно заряженный аминокислотный остаток, а СНЗ дикого типа обычно имеет нейтральный аминокислотный остаток в этом положении, при этом указанные

последовательности нуклеиновых кислот вводят последовательно или одновременно. Указанные способы получения указанных клеток-хозяев предпочтительно дополнительно включают стадию введения в указанную клетку-хозяина последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей общую легкую цепь, или в другом варианте указанные способы интегрируют указанные последовательности нуклеиновых кислот в клетку-хозяин, которая уже имеет последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей общую легкую цепь, временно, но предпочтительно стабильно интегрированную в клетку-хозяина.

Также в настоящем изобретении предусматривают рекомбинантную клетку-хозяина, содержащую последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие по меньшей мере первую, вторую, третью и четвертую полипептидные цепи, содержащие домен СНЗ, где по меньшей мере две из указанных нуклеиновых кислот снабжены средствами для предпочтительного спаривания указанных первого и второго полипептидов, содержащих домен СНЗ, и указанных третьего и четвертого полипептидов, содержащих домен СНЗ.

В настоящем изобретении дополнительно предусматривают рекомбинантную клетку-хозяина, содержащую последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие по меньшей мере первую и вторую полипептидные цепи, содержащие домен СНЗ, где указанная первая полипептидная цепь, содержащая домен СНЗ, содержит положительно заряженный аминокислотный остаток, где СНЗ дикого типа обычно имеет нейтральный аминокислотный остаток в этом положении, и где указанная вторая полипептидная цепь, содержащая домен СНЗ, содержит отрицательно заряженный аминокислотный остаток, где СНЗ дикого типа обычно имеет остаток нейтральной аминокислоты в этом положении.

Рекомбинантная клетка-хозяин по настоящему изобретению может дополнительно содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую общую легкую цепь.

«Клеткой-хозяином» по настоящему изобретению может быть любая клетка-хозяин, способная экспрессировать молекулы рекомбинантной ДНК, включая бактерий, таких как, например, *Escherichia* (например, *E. coli*), *Enterobacter*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, дрожжи, такие как *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *P. pastoris*, *Candida* или *Yarrowia*, мицелиальные грибы, такие как *Neurospora*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans* и *Aspergillus niger*, клетки насекомых, такие как клетки *Spodoptera frugiperda* SF-9 или SF-21, и

предпочтительно клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки ВНК, клетки мыши, включая клетки SP2/0 и клетки миеломы NS-0, клетки приматов, такие как клетки COS и Vero, клетки MDCK, клетки BRL 3A, гибридомы, опухолевые клетки, иммортализованные первичные

5 клетки, клетки человека, такие как W138, HepG2, HeLa, HEK293, HT1080, или эмбриональные клетки сетчатки, такие как PER. С6 и другие. Часто выбранная система экспрессии будет включать вектор экспрессии клетки млекопитающего и хозяина, так что антитела могут быть соответствующим образом гликозилированы. Линия клеток человека может быть использована для

10 получения антител с полностью человеческим типом гликозилирования. Условия выращивания или размножения клеток (см., например, кн.: «Tissue Culture», изд-во Academic Press, под ред. Kruse и Paterson, 1973) и условия экспрессии рекомбинантного продукта могут несколько различаться, и оптимизация процесса обычно проводится для увеличения выхода доли продукта и/или роста

15 клеток по отношению друг к другу в соответствии со способами, общеизвестными специалистам в данной области. В общем, принципы, протоколы и практические методы для максимизации продуктивности культур клеток млекопитающих можно найти в кн.: «Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach» (под ред. M. Butler, изд-во IRL Press, 1991). Экспрессия

20 антител в рекомбинантных клетках-хозяевах подробно описана в данной области. Нуклеиновые кислоты, кодирующие легкую и тяжелую цепи, могут присутствовать в виде внехромосомных копий и/или стабильно интегрированы в хромосому клетки-хозяина.

Другой задачей, решаемой в настоящем изобретении, является получение

25 культуры рекомбинантных клеток-хозяев по настоящему изобретению или культуры рекомбинантных клеток-хозяев, которую можно получить способом по настоящему изобретению, причем указанная культура продуцирует либо один, либо несколько гетеродимерных полипептидов.

Для получения экспрессии последовательностей нуклеиновых кислот,

30 кодирующих полипептиды, содержащие домен СНЗ, специалистам в данной области техники известно, что последовательности, способные управлять такой экспрессией, могут быть функционально связаны с последовательностями нуклеиновых кислот, кодирующими полипептиды, содержащие домен СНЗ. Термин «функционально связанные» означает, что последовательности

нуклеиновых кислот, кодирующие полипептиды, содержащие домен СНЗ, или их предшественники, связаны с последовательностями, способными управлять экспрессией, таким образом, что эти последовательности могут управлять экспрессией полипептидов, содержащих домен СНЗ, или их предшественников.

5 Применимые векторы экспрессии доступны в данной области техники, например, серия плазмидных векторов pcDNA фирмы Invitrogen. Когда последовательность, кодирующая представляющий интерес полипептид, надлежащим образом интегрирована относительно последовательностей, управляющих транскрипцией и трансляцией кодируемого полипептида, 10 получаемая кассета экспрессии может быть использована для получения представляющего интерес полипептида в процессе, называемого экспрессией. Последовательности, управляющие экспрессией, могут включать промоторы, энхансеры и т.п., а также их комбинации. Они должны быть способны функционировать в клетке-хозяине, тем самым стимулируя экспрессию 15 последовательностей нуклеиновых кислот, которые функционально с ними связаны. Промоторы могут быть конститутивными или регулируемыми и могут быть получены из различных источников, включая вирусы, прокариотические или эукариотические источники, или могут быть созданы искусственно. Экспрессия представляющих интерес нуклеиновых кислот может происходить с 20 природного промотора или его производного или из полностью гетерологичного промотора. Некоторые хорошо известные и часто используемые промоторы для экспрессии в эукариотических клетках включают промоторы, полученные из вирусов, таких как аденовирус, например, промотор E1A, промоторы, полученные из цитомегаловируса (CMV), такие как промотор немедленного раннего ответа CMV, промоторы, полученные из вируса обезьян Simian Virus 40 (SV40) и т.п. Применимые промоторы также могут быть получены из 25 эукариотических клеток, такие как промоторы металлотioneина (MT), промотор фактора элонгации 1a (EF-1a), промотор актина, промотор иммуноглобулина, промоторы теплового шока и т.п. Любой промотор или энхансер/промотор, 30 способный управлять экспрессией представляющей интерес последовательности в клетке-хозяине, применим в настоящем изобретении. В одном варианте осуществления настоящего изобретения последовательность, способная управлять экспрессией, содержит область промотора CMV, предпочтительно область, содержащую нуклеотиды от -735 до +95 энхансера/промотора

немедленного раннего ответа CMV. Специалисту в данной области известно, что последовательности экспрессии, используемые в настоящем изобретении, могут подходящим образом комбинироваться с элементами, которые могут стабилизировать или усиливать экспрессию, такими как инсуляторы, области прикрепления к матрице, элементы STAR (WO 03/004704) и т.п. Это может повышать стабильность и/или уровни экспрессии.

Продуцирование белка в рекомбинантных клетках-хозяевах подробно описано, например, в кн.: «Current Protocols in Protein Science», 1995, Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT, ISBN 0-471-11184-8; Bendig, 1988. Культивирование клеток проводят для того, чтобы они могли метаболизироваться, и/или расти, и/или делиться, и/или продуцировать представляющие интерес рекомбинантные белки. Это может быть достигнуто способами, хорошо известными специалистам в данной области, и включает, но не ограничивается им, обеспечение клетки питательными веществами. Способы включают рост, прикрепление к поверхностям, рост в суспензии или их комбинации. Некоторые условия культивирования можно оптимизировать способами, хорошо известными в данной области, для оптимизации выхода выработки белка. Культивирование можно проводить, например, в чашках, колбах, качалочных колбах или в биореакторах с использованием систем периодического действия, периодического действия с подпиткой, систем непрерывного действия, полых волокон и т.п. Для достижения крупномасштабного (непрерывного) производства рекомбинантных белков с помощью клеточной культуры используют клетки, способные расти в суспензии, и эти клетки можно культивировать в отсутствие сыворотки животного или человеческого происхождения или компонентов сыворотки. Таким образом, очистка упрощается, а безопасность повышается благодаря отсутствию дополнительных белков животного или человеческого происхождения, полученных из культуральной среды, в то время как система также очень надежна, поскольку синтетические среды обеспечивают наилучшую воспроизводимость.

Иммуноглобулиноподобные полипептиды экспрессируются в клетках-хозяевах и их выделяют из клеток или, предпочтительно, из среды для культивирования клеток способами, которые обычно известны специалистам в данной области. После выделения эти Ig-подобные полипептиды могут быть

разделены методами, известными в данной области. Такие методы могут включать преципитацию, центрифугирование, фильтрацию, эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию, катионообменную и/или анионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию и т.п. Для смеси антител, содержащих полипептиды IgG, можно использовать аффинную хроматографию с белком А или белком G (см., например, US 4801687 и US 5151504).

После захвата с помощью аффинной хроматографии используют стадии ортогональной полировки для удаления любых оставшихся примесей, связанных с процессом, к которым могут относиться гомодимеры, варианты заряда, БКХ и ДНК. Обычно для получения отделенного биспецифического антитела или поливалентного мультимера предпринимаются следующие стадии, включая культивирование клеток-хозяев, осветление собранного болка с последующим захватом белка, анионообменной хроматографией, в том числе для удаления ДНК клетки-хозяина, затем для удаления хозяина используют метод СІЕХ для удаления клеточного белка, выщелоченного белка А и потенциальных агрегатов с последующими дополнительными этапами, такими как фильтрация вируса. Специалистам в данной области техники известно, что порядок таких стадий может быть изменен или отдельные стадии могут быть заменены или исключены. Например, альтернативы второму этапу полировки включают хроматографию гидрофобного взаимодействия и смешанную хроматографию.

Иммуноглобулиноподобные полипептиды и/или их смеси, полученные способами по настоящему изобретению, предпочтительно имеют общую легкую цепь. Таким образом, дополнительно предложен способ согласно настоящему изобретению, дополнительно включающий обеспечение указанной клетки-хозяина нуклеиновой кислотой, кодирующей общую легкую цепь. Это легкая цепь, которая способна образовывать пары по меньшей мере с двумя разными тяжелыми цепями, образует тем самым функциональные антигенсвязывающие домены. Функциональный антигенсвязывающий домен способен специфически связываться с антигеном. В одном варианте осуществления настоящего изобретения используют общую легкую цепь, которая способна спариваться со всеми тяжелыми цепями, полученными с помощью способа согласно настоящему изобретению, тем самым образуя функциональные антигенсвязывающие домены, чтобы избежать неправильного спаривания

несовпадающих тяжелых и легких цепей. В одном варианте осуществления настоящего изобретения используют только общие легкие цепи с одной идентичной аминокислотной последовательностью. В другом варианте осуществления настоящего изобретения специалисты в данной области поймут, что понятие «общие» также относится к функциональным эквивалентам легкой цепи, аминокислотная последовательность которых не идентична. Существует множество вариантов указанной легкой цепи, в которых присутствуют мутации (делеции, замены, добавления), которые существенно не влияют на образование функциональных участков связывания. Таким образом, такие варианты также способны связывать различные тяжелые цепи и образовывать функциональные антигенсвязывающие домены. Термин «обычная легкая цепь», используемый в настоящем изобретении, таким образом, относится к легким цепям, которые могут быть идентичными или иметь некоторые отличия в аминокислотной последовательности, сохраняя при этом специфичность связывания полученного антитела после спаривания с тяжелой цепью. Например, можно получить или найти легкие цепи, которые не являются идентичными, но все же функционально эквивалентны, например, путем введения и тестирования консервативных аминокислотных замен и/или замен аминокислот в участках, которые не вносят вклад или лишь частично вносят вклад в специфичность связывания в сочетании с тяжелой цепью и т.п. Комбинация определенной обычной легкой цепи и таких функционально эквивалентных вариантов охватывается термином «обычная легкая цепь». Ссылка делается на WO 2004/009618 для подробного описания использования обычных легких цепей. Предпочтительно, в настоящем изобретении используют обычную легкую цепь, которая представляет собой легкую цепь, подобную легкой цепи зародышевой линии, более предпочтительно легкую цепь зародышевой линии, предпочтительно реаранжированную легкую цепь каппа зародышевой линии человека, наиболее предпочтительно либо реаранжированную легкую цепь каппа зародышевой линии человека IgV $\kappa$ 1-39/J $\kappa$  или IG V $\kappa$ 3-20/J $\kappa$ . Общая легкая цепь предпочтительно содержит переменную область легкой цепи, как указано выше, с инсерциями, делециями, заменами, добавлениями от 0 до 5 аминокислот или их комбинаций. Другой предпочтительной обычной легкой цепью является легкая каппа-цепь человека IgV $\kappa$ 1-39/IGJ $\kappa$ 5. Предпочтительно антитело по настоящему изобретению содержит переменную область легкой каппа-цепи

человека IgV $\kappa$ 1-39/IGJ $\kappa$ 5. Еще одной предпочтительной обычной легкой цепью является легкая каппа-цепь IgV $\kappa$ 3-15/IGJ $\kappa$ 1 человека. Предпочтительно антитело по настоящему изобретению содержит переменную область легкой каппа-цепи человека IgV $\kappa$ 3-15/IGJ $\kappa$ 1. Еще одной предпочтительной обычной легкой цепью является легкая каппа-цепь человека IgV $\kappa$ 3-20/IGJ $\kappa$ 1. Предпочтительно антитело по настоящему изобретению содержит переменную область легкой цепи каппа человека IgV $\kappa$ 3-20/IGJ $\kappa$ 1. Еще одна предпочтительная общая легкая цепь представляет собой легкую цепь лямбда человека IgV $\lambda$ 3-21/IGJ $\lambda$ 3. Предпочтительно антитело по настоящему изобретению содержит переменную область легкой цепи каппа человека IgV $\lambda$ 3-21/IGJ $\lambda$ 3.

В другом варианте специалист в данной области техники может выбрать в качестве альтернативы использованию обычной легкой цепи и во избежание ошибочного спаривания несовпадающих тяжелых и легких цепей средства для принудительного спаривания тяжелой и легкой цепей, например, таких, как описанные в WO2009/080251, WO2009/080252 и/или WO2009/080253.

Авторы изобретения ранее описали экспрессию аминокислот СНЗ, имеющих заряженные остатки, где СНЗ дикого типа имеет нейтральный аминокислотный остаток в этом положении, так что разные заряды двух доменов СНЗ вызывают стабильное взаимодействие (например, первый СНЗ, имеющий положительно заряженные остатки в положениях 351 и 366, и второй СНЗ, имеющий отрицательно заряженные остатки в положениях 351 и 368). Варианты и модифицированные тяжелые цепи по настоящему изобретению могут быть включены с помощью указанных выше средств стимуляции гетеродимеризации или других средств, известных специалистам в данной области. Объекты настоящего изобретения обеспечивают дополнительную способность стимулировать гетеродимеризацию доменов СНЗ, а также могут повышать стабильность гетеродимеризации или снижать стабильность гомодимера на основе варианта (вариантов) аминокислотных остатков на границе раздела СНЗ и, предпочтительно, комбинаций вышеуказанных преимуществ.

Гетеродимеры по настоящему изобретению более стабильны по сравнению с димерами дикого типа (димер дикого типа определяют как биспецифический IgG (AB) без инженерии СНЗ, в отличие от его гомодимеров (AA или BB)), и их легче выделить от смеси и отделить от примеси. Неожиданно оказалось возможным еще больше увеличить долю одного или нескольких

представляющих интерес Ig-подобных полипептидов в смеси. Известные в данной области способы преимущественного получения гетеродимера (например, биспецифического антитела) обычно включают получение некоторых нежелательных димерных побочных продуктов. Например, доля представляющего интерес биспецифического антитела с использованием технологии «выступ-во-впадину», известной специалистам в данной области техники, составляет в лучшем случае 87%, тогда как методика электростатической инженерии, при которой заряженные контактные аминокислоты заменены аминокислотами противоположного заряда, приводит согласно сообщениям к содержанию до 96%. В настоящем описании было разработаны успешные варианты, которые дополнительно увеличивают долю представляющего интерес гетеродимерного полипептида.

Настоящее изобретение направлено на домен (домены) CH3, содержащий по меньшей мере один вариант остатка в положениях K360, S364 и/или K409. Эти варианты остатков более подробно описаны ниже. Если за буквой следует число, за которым следует еще одна буква, это указывает на аминокислоту в нативном положении (например, Fc дикого типа человека) остатка в соответствии с нумерацией ЕС, и на остаток, сконструированный в этом положении (например, K409S означает, что лизин (K) присутствует в Fc дикого типа в положении 409, сконструированная вариация представляет собой серин (S)). Нумерацию Евросоюза (ЕС) см., например: [http://www.imgt.org/IMGTSscientificChart/Numbering/Hu\\_IGHGnber.html](http://www.imgt.org/IMGTSscientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают способ получения гетеродимерного полипептида из одной клетки, где указанный гетеродимерный полипептид содержит аминокислотные варианты в положениях K360, S364 и/или K409, причем указанный способ включает введение в указанную клетку:

- а. первой нуклеиновой кислоты, кодирующей 1-ю полипептидную цепь, содержащую домен CH3,
- б. второй нуклеиновой кислоты, кодирующей 2-ю полипептидную цепь, содержащую домен CH3,

где 1-й полипептид, содержащий домен CH3, содержит варианты в положениях K360, S364 и/или K409, причем указанный способ дополнительно включает стадию культивирования указанной клетки-хозяина и обеспечения

экспрессии указанных двух нуклеиновых кислот и выделения указанных гетеродимерных Ig-подобных полипептидов из культуры.

Таким образом, в одном варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают гетеродимерный полипептид, причем указанный гетеродимерный полипептид содержит два домена СНЗ, где указанная полипептидная цепь, содержащая 1-й домен СНЗ, содержит варианты аминокислот DE, и где указанная полипептидная цепь, содержащая 2-й домен СНЗ, содержит варианты аминокислот КК и где один или несколько остатков в одном или нескольких положениях К360, S364 и/или К409 в указанной полипептидной цепи, содержащей 1-й домен СНЗ, представляют собой вариант по сравнению с остатком дикого типа человека.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают способ получения гетеродимерного полипептида из одной клетки, включающий введение в указанную клетку:

а. первой нуклеиновой кислоты, кодирующей 1-ю полипептидную цепь, содержащую домен СНЗ, и

б. второй нуклеиновой кислоты, кодирующей 2-ю полипептидную цепь, содержащую домен СНЗ,

при этом полипептидные цепи, содержащие 1-й домен СНЗ, содержат DE и дополнительные варианты аминокислот в положениях К360, S364 и/или К409,

при этом полипептидные цепи, содержащие 2-й домен СНЗ, содержат КК, и указанный способ дополнительно включает стадию культивирования указанной клетки-хозяина и обеспечения экспрессии указанных двух нуклеиновых кислот и сбора указанных гетеродимерных Ig-подобных полипептидов из выращенной культуры.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения вариант остатка (остатков) в положениях К360, S364 и/или К409 комбинируют с другими вариантами гетеродимеризации, включая, например, замену «выступ-во-впадину», замены с противоположным зарядом в области СНЗ или другие методы, известные специалистам в данной области.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает стадию обеспечения указанной клетки-хозяина нуклеиновой кислотой, кодирующей общую легкую цепь, которая имеет преимущества, описанные в настоящем изобретении ранее.

Как было обосновано в настоящем описании, описан гетеродимерный белок, содержащий первый СНЗ-содержащий полипептид и второй СНЗ-содержащий полипептид, где указанный первый СНЗ-содержащий полипептид содержит дополнительный вариант аминокислоты в положениях S364, K409 и/или K360. Необязательно, первый и второй полипептиды СНЗ являются человеческими.

Например, первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, может включать аминокислоту S364V.

В другом варианте первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, может включать аминокислоту S364I.

В другом примере первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, может включать аминокислоту S364T.

В другом примере первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, может включать аминокислоту S364Q.

В другом варианте первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, может включать аминокислоту S364L.

Первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, может включать вариант аминокислоты в положении K409 в качестве альтернативы или дополнения к аминокислотному варианту в положении S364 (например, S364V, S364I, S364T, S364Q или S364L, подробнее описанные выше).

Соответственно, первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, может включать аминокислоту K409I, необязательно в дополнение к аминокислотному варианту в положении S364 (например, S364V, S364I, S364T, S364Q или S364L, подробнее описанные выше).

В другом варианте первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, может включать аминокислоту K409L, необязательно в дополнение к аминокислотному варианту в положении S364 (например, S364V, S364I, S364T, S364Q или S364L, подробнее описанные выше).

В другом примере первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СН3 IgG человека, может включать аминокислоту К409Е, необязательно в дополнение к аминокислотному варианту в положении S364 (например, S364V, S364I, S364T, S364Q или S364L, подробнее описанные выше).

Первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СН3 IgG человека, может включать аминокислотный вариант в положении К360 в качестве альтернативы или дополнения к аминокислотному варианту в положении S364 (например, S364V, S364I, S364T, S364Q или S364L, подробнее описанные выше) и/или вариант в положении К409 (например, К409I, К409L или К409Е, подробнее описанные выше).

Соответственно, первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СН3 IgG человека, может включать аминокислоту К360D, необязательно в дополнение к аминокислотному варианту в положении S364 (например, S364V, S364I, S364T, S364Q или S364L, подробнее описанные выше) и/или необязательно в дополнение к аминокислотному варианту в положении К409 (например, К409I, К409L или К409Е, подробнее описанные выше).

В одном примере гетеродимерный белок содержит первый полипептид, содержащий СН3 IgG человека, и второй полипептид, содержащий СН3 IgG человека, где первый полипептид, содержащий СН3 IgG человека, содержит дополнительный вариант аминокислоты в положении S364, К409 и/или К360. Необязательно, указанный первый полипептид, содержащий СН3 IgG человека, дополнительно содержит аминокислотные варианты L351D и L368E, а указанный второй полипептид, содержащий СН3 IgG человека, содержит аминокислотные варианты T366K и L351K.

Например, первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СН3 IgG человека, может включать аминокислоту S364V.

В другом варианте первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СН3 IgG человека, может включать аминокислоту S364I.

В другом примере первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СН3 IgG человека, может включать аминокислоту S364T.

В еще одном примере первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СН3 IgG человека, может включать аминокислоту S364Q.

5 В другом варианте первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СН3 IgG человека, может включать аминокислоту S364L.

10 Первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СН3 IgG человека, может включать вариант аминокислоты в положении К409 в качестве альтернативы или в дополнение к варианту аминокислоты в положении S364 (например, S364V, S364I, S364T, S364Q или S364L, как подробно описано выше).

15 Соответственно, первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СН3 IgG человека, может включать аминокислоту К409I, необязательно в дополнение к варианту аминокислоты в положении S364 (например, S364V, S364I, S364T, S364Q или S364L, как подробно описано выше).

20 В другом варианте первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СН3 IgG человека, может включать аминокислоту К409L, необязательно в дополнение к варианту аминокислоты в положении S364 (например, S364V, S364I, S364T, S364Q или S364L, как подробно описано выше).

25 В другом примере первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СН3 IgG человека, может включать аминокислоту К409E, необязательно в дополнение к варианту аминокислоты в положении S364 (например, S364V, S364I, S364T, S364Q или S364L, как подробно описано выше).

30 Первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СН3 IgG человека, может включать вариант аминокислоты в положении К360 в качестве альтернативы или в дополнение к варианту аминокислоты в положении S364 (например, S364V, S364I, S364T, S364Q или S364L, как подробно описано выше) и/или вариант в положении К409 (например, К409I, К409L или К409E, как подробно описано выше).

Соответственно, первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СН3 IgG человека, может включать аминокислоту К360D

необязательно в качестве дополнения к варианту аминокислоты в положении S364 (например, S364V, S364I, S364T, S364Q или S364L, как подробно описано выше) и/или необязательно в дополнение к варианту аминокислоты в положении K409 (например, K409I, K409L или K409E, как подробно описано выше).

5 В одном примере описан гетеродимерный белок, содержащий первый полипептид, содержащий СН3 IgG человека, и второй полипептид, содержащий СН3 IgG человека, где указанный первый полипептид, содержащий СН3 IgG человека, содержит варианты аминокислот L351D и L368E и указанный второй полипептид, содержащий СН3 IgG человека, содержит варианты аминокислот  
10 T366K и L351K, и где первый полипептид, содержащий СН3 IgG человека, содержит дополнительный вариант аминокислоты в положениях S364, K409 и/или K360.

Соответственно, в одном варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают гетеродимерный белок, содержащий первый полипептид,  
15 содержащий СН3 IgG человека, и второй полипептид, содержащий СН3 IgG человека, где указанный первый полипептид, содержащий СН3 IgG человека, содержит аминокислотный вариант L351D и L368E, а указанный второй полипептид, содержащий СН3 IgG человека, содержит аминокислотные варианты T366K и L351K, и где первый полипептид, содержащий СН3 IgG  
20 человека, содержит еще один аминокислотный вариант в положении S364.

В конкретном примере аминокислота в положении 364 представляет собой валин, изолейцин, треонин, глутамин или лейцин.

В одном варианте осуществления аминокислота в положении 364 представляет собой валин.

25 В одном варианте осуществления аминокислота в положении 364 представляет собой изолейцин.

В одном варианте осуществления аминокислота в положении 364 представляет собой треонин.

30 В одном варианте осуществления аминокислота в положении 364 представляет собой глутамин.

В одном варианте осуществления аминокислота в положении 364 представляет собой лейцин.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают гетеродимерный белок, содержащий первый СН3-содержащий

полипептид IgG человека и второй СНЗ-содержащий IgG полипептид человека, где указанный первый СНЗ-содержащий полипептид IgG человека содержит аминокислотный вариант L351D и L368E и указанный второй СНЗ-содержащий полипептид IgG человека содержит аминокислотный вариант T366K и L351K, и  
5 где первый первый СНЗ-содержащий полипептид IgG человека содержит дополнительный аминокислотный вариант в положении K409.

В конкретном примере аминокислота в положении 409 представляет собой изолейцин, лейцин или глутамат.

10 В одном варианте осуществления настоящего изобретения аминокислота в положении 409 представляет собой изолейцин.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения аминокислота в положении 409 представляет собой лейцин.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения аминокислота в положении 409 представляет собой глутамат.

15 В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают гетеродимерный белок, содержащий первый СНЗ-содержащий полипептид IgG человека и второй СНЗ-содержащий IgG полипептид человека, где указанный первый СНЗ-содержащий полипептид IgG человека содержит аминокислотный вариант L351D и L368E и указанный второй СНЗ-содержащий  
20 полипептид IgG человека включает вариант аминокислоты T366K и L351K, и где первый СНЗ-содержащий полипептид IgG человека содержит дополнительный вариант аминокислоты в положении K360.

В конкретном примере аминокислота в положении 360 представляет собой аспарат.

25 Варианты аминокислот, описанные в настоящем изобретении, могут относиться к одной вариации в положении S364, положении K409 или положении K360 в плече «DE» гетеродимерных белков по настоящему изобретению. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения гетеродимерные белки имеют по меньшей мере две вариации в  
30 положениях, выбранных из: S364, K409 или K360. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения гетеродимерные белки имеют по меньшей мере три дополнительные вариации в положениях S364, K409 и K360.

Таким образом, в одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен гетеродимерный белок, содержащий первый СНЗ-содержащий

полипептид IgG человека и второй СНЗ-содержащий IgG полипептид человека, где указанный первый СНЗ-содержащий полипептид IgG человека содержит аминокислотный вариант L351D и L368E и указанный второй СНЗ-содержащий IgG полипептид человека содержит дополнительный вариант аминокислот в положениях S364 и K409, где аминокислота в положении 364 представляет собой валин, изолейцин, треонин, глутамин или лейцин, а аминокислота в положении 409 представляет собой изолейцин, лейцин или глутамат.

Например, первый описанный в настоящем изобретении СНЗ-содержащий полипептид IgG человека может содержать аминокислоту S364V и аминокислоту K409I. Альтернативно, первый СНЗ-содержащий полипептид IgG человека может содержать аминокислоту S364V и аминокислоту K409L. В одном из примеров первый описанный в настоящем изобретении СНЗ-содержащий полипептид IgG человека может содержать аминокислоту S364V и аминокислоту K409E.

В другом примере первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, может включать аминокислоту S364I и аминокислоту K409I. В другом варианте первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, может включать аминокислоту S364I и аминокислоту K409L. В одном из примеров первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, может включать аминокислоту S364I и аминокислоту K409E.

В другом примере первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, может включать аминокислоту S364T и аминокислоту K409I. В другом варианте первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, может включать аминокислоту S364T и аминокислоту K409L. В одном из примеров первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, может включать аминокислоту S364T и аминокислоту K409E.

В другом примере первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, может включать аминокислоту S364Q и аминокислоту K409I. В другом варианте первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, может включать аминокислоту S364Q и аминокислоту K409L. В одном из примеров

первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СН3 IgG человека, может включать аминокислоту S364Q и аминокислоту K409E.

В другом примере первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СН3 IgG человека, может включать аминокислоту S364L и аминокислоту K409I. В другом варианте первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СН3 IgG человека, может включать аминокислоту S364L и аминокислоту K409L. В одном из примеров первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СН3 IgG человека, может включать аминокислоту S364L и аминокислоту K409E.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предложен гетеродимерный белок, содержащий первый полипептид, содержащий СН3 IgG человека, и второй полипептид, содержащий СН3 IgG человека, где указанный полипептид, содержащий первый IgG СН3 человека, содержит варианты аминокислот L351D и L368E, и указанный второй полипептид, содержащий СН3 IgG человека, содержит варианты аминокислот T366K и L351K, причем первый полипептид, содержащий СН3 IgG человека, содержит дополнительный вариант аминокислот в положениях S364 и K360, а аминокислота в положении 364 представляет собой валин, изолейцин, треонин, глутамин или лейцин, и аминокислота в положении 360 представляет собой аспаратат.

Например, первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СН3 IgG человека, может содержать аминокислоту S364V и аминокислоту K360D.

В другом примере первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СН3 IgG человека, может содержать аминокислоту S364I и аминокислоту K360D.

В другом примере первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СН3 IgG человека, может содержать аминокислоту S364T и аминокислоту K360D.

В другом примере первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СН3 IgG человека, может содержать аминокислоту S364Q и аминокислоту K360D.

В другом примере первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СН3 IgG человека, может содержать аминокислоту S364L и аминокислоту K360D.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают гетеродимерный белок, содержащий первый полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, и второй полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, где указанный первый полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, содержит варианты аминокислот в положениях L351D и L368E, и указанный второй полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, содержит варианты аминокислот T366K и L351K, причем первый полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, содержит дополнительный вариант аминокислот в положениях K409 и K360, где аминокислота в положении 409 представляет собой изолейцин, лейцин или глутамат, а аминокислота в положении 360 представляет собой аспарат.

Например, первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, может содержать аминокислоту K409I и аминокислоту K360D.

В другом примере первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, может содержать аминокислоту K409L и аминокислоту K360D.

В другом примере первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, может содержать аминокислоту K409E и аминокислоту K360D.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предложен гетеродимерный белок, содержащий первый полипептид, включающий СНЗ IgG человека, и второй полипептид, включающий СНЗ IgG человека, где указанный первый полипептид, содержащий IgG СНЗ человека, содержит варианты аминокислот L351D и L368E, и указанный второй полипептид, содержащий IgG СНЗ человека, содержит варианты аминокислот T366K и L351K, причем первый полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, содержит дополнительный аминокислотный вариант в положениях S364, K409 и K360, где аминокислота в положении 364 представляет собой валин, изолейцин, треонин, глутамин или лейцин; аминокислота в положении 409 представляет собой изолейцин, лейцин или глутамат; а аминокислота в положении 360 представляет собой аспарат.

Например, первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, может включать K409I и K360D. В другом варианте, первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, может включать S364V, K409L и K360D. В одном примере

первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий CH3 IgG человека, может включать S364V, K409E и K360D.

В другом примере первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий CH3 IgG человека, может включать S364I, K409I and  
5 K360D. В другом варианте осуществления настоящего изобретения первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий CH3 IgG человека, может включать S364I, K409L и K360D. В одном из примеров первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий CH3 IgG человека, может включать S364I, K409E и K360D.

10 В другом примере первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий CH3 IgG человека, может включать S364T, K409I и K360D. В другом варианте осуществления настоящего изобретения первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий CH3 IgG человека, может включать S364T, K409L и K360D. В одном из примеров первый  
15 описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий CH3 IgG человека, может включать S364T, K409E и K360D.

В другом примере первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий CH3 IgG человека, может включать S364Q, K409I и  
20 K360D. В другом варианте первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий CH3 IgG человека, может включать S364Q, K409L и K360D. In one example первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий CH3 IgG человека, может включать S364Q, K409E и K360D.

В другом примере первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий CH3 IgG человека, может включать S364L, K409I и  
25 K360D. В другом варианте осуществления настоящего изобретения первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий CH3 IgG человека, может включать S364L, K409L и K360D. В одном из примеров первый описанный в настоящем изобретении полипептид, содержащий CH3 IgG человека, может включать S364L, K409E и K360D.

30 В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения аминокислота в положении 360 является аспаратом, а аминокислота в положении 364 является изолейцином.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения аминокислота в положении 360 является аспаратом, а аминокислота в положении 364 является треонином.

5 В одном варианте осуществления настоящего изобретения аминокислота в положении 360 является аспаратом, а аминокислота в положении 364 является валином.

В еще одном из вариантов осуществления настоящего изобретения аминокислота в положении 360 является аспаратом, а аминокислота в положении 409 является глутаматом.

10 В другом варианте осуществления настоящего изобретения аминокислота в положении 364 является лейцином, и аминокислота в положении 409 является лейцином.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения аминокислота в положении 364 является треонином, а аминокислота в положении 409 является глутаматом.

15 Варианты полипептидов могут быть созданы любыми подходящими методами, известными в данной области. Варианты, описанные в настоящем изобретении, могут быть основаны на домене СН3 IgG человека, но с одной или несколькими исходными аминокислотами (в положениях 360, 364 и/или 409), отличающимися от соответствующего положения аминокислоты СН3 IgG человека, согласно описанию настоящего изобретения.

20 Последовательности доменов СН3 IgG человека хорошо известны в данной области. При изменении одной или нескольких аминокислот в полипептиде изменяются боковые цепи в этих положениях. Аминокислотные вариации, описанные в настоящем документе, могут быть введены в нуклеиновые кислоты, кодирующие домен СН3, или в сам домен СН3 посредством вариации средств, включая генетические средства с использованием молекулярной биологии, или ферментативными или химическими средствами. Соответствующие способы создания описанных здесь вариантов хорошо известны в данной области.

30 Например, варианты нуклеиновых кислот могут быть созданы *de novo* путем синтеза нуклеиновых кислот, которые кодируют варианты последовательностей, и могут быть заказаны у любого из поставщиков. Аналогично, варианты нуклеиновых кислот могут быть получены с помощью методов мутагенеза, хорошо известных в данной области. Такие нуклеиновые кислоты, кодирующие

вариант полипептида, могут быть затем клонированы в клетки-хозяева, экспрессированы и проанализированы, если это необходимо. Эти методы осуществляются с использованием хорошо известных процедур, а различные методы, которые могут найти применение, описаны в кн.: Maniatis, «Molecular Cloning - A Laboratory Manual», 3е изд. (изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Нью-Йорк, 2001) и в кн.: «Current Protocols in Molecular Biology» (изд-во John Wiley & Sons), которые полностью включены в настоящее описание в виде ссылок. Нуклеиновые кислоты, которые кодируют варианты, могут быть включены в вектор экспрессии для экспрессии белка. Векторы экспрессии обычно включают промотор, связанный с контрольными или регуляторными последовательностями, селективные маркеры, любые слитые партнеры и/или дополнительные элементы. Варианты могут быть получены путем культивирования клетки-хозяина, трансформированной нуклеиновой кислотой, предпочтительно вектором экспрессии, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую варианты, в подходящих условиях для индукции экспрессии белка. Можно использовать широкий спектр подходящих клеток-хозяев, включая, но, не ограничиваясь ими, клетки млекопитающих, бактерии, клетки насекомых и дрожжи. Например, различные клеточные линии, которые могут найти применение, описаны в каталоге клеточных линий АТСС, доступном в Американской коллекции типовых культур, полностью включенном в настоящее описание в качестве ссылки. Способы введения экзогенной нуклеиновой кислоты в клетки-хозяева хорошо известны в данной области и их можно варьировать в зависимости от используемой клетки-хозяина.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ получения по меньшей мере двух различных Ig-подобных молекул или получения гетеродимерной Ig-подобной молекулы, где каждая из полипептидных цепей, содержащих домен СН3, дополнительно содержит переменную область, распознающую другой целевой эпитоп, причем целевые эпитопы расположены в одной и той же молекуле. Это часто позволяет более эффективно противодействовать (биологической) функции указанной молекулы-мишени по сравнению с ситуацией, когда целью является только один эпитоп. Например, гетеродимерная молекула, подобная иммуноглобулину, может одновременно связываться с 2 эпитопами, присутствующими, например, на рецепторах фактора роста или растворимых молекулах, важных для

пролиферации опухолевых клеток, тем самым эффективно блокируя несколько независимых сигнальных путей, ведущих к неконтролируемой пролиферации, и любая комбинация по меньшей мере двух Ig-подобные молекулы могут одновременно связываться с 2 или даже с 3 или 4 эпитопами, присутствующими на таких рецепторах фактора роста или растворимых молекулах.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения целевая молекула представляет собой растворимую молекулу. В другом варианте осуществления настоящего изобретения целевая молекула представляет собой молекулу, связанную с мембраной.

В другом объекте настоящего изобретения предложен способ получения одной или нескольких гетеродимерных иммуноглобулиноподобных молекул, где каждая из полипептидных цепей, содержащих домен СН3, дополнительно содержит вариабельную область, распознающую целевой эпитоп, при этом целевые эпитопы расположены на разных молекулах. В этом случае каждая из разных целевых молекул может быть либо растворимой молекулой, либо молекулой, связанной с мембраной. В одном варианте осуществления настоящего изобретения различные целевые молекулы являются растворимыми молекулами. В другом варианте одна целевая молекула является растворимой молекулой, тогда как вторая целевая молекула связана с мембраной. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения обе целевые молекулы связаны с мембраной. В еще одном варианте разные целевые молекулы экспрессируются на одних и тех же клетках, тогда как в других вариантах разные молекулы-мишени экспрессируются на разных клетках. В качестве примера, не ограничивающего настоящее изобретения, любая гетеродимерная иммуноглобулиноподобная молекула или любая комбинация по меньшей мере двух иммуноглобулиноподобных молекул может быть применима для одновременного блокирования множества мембраносвязанных рецепторов, нейтрализации множества растворимых молекул, таких как цитокины или факторы роста опухолевых клеток, или для нейтрализации различных вирусных серотипов или вирусных штаммов.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ получения одной или нескольких гетеродимерных молекул, подобных иммуноглобулинам, где по меньшей мере один из указанных целевых эпитопов расположен на опухолевой клетке. В другом варианте осуществления

настоящего изобретения или дополнительно по крайней мере один из указанных целевых эпитопов расположен на поверхности эффекторной клетки. Это применимо, например, для привлечения Т-клеток или НК-клеток для уничтожения опухолевых клеток. Например, по меньшей мере одну Ig-подобную молекулу получают способом согласно настоящему изобретению, который способен рекрутировать иммунные эффекторные клетки, предпочтительно иммунные эффекторные клетки человека, путем специфического связывания с молекулой-мишенью, расположенной на иммунных эффекторных клетках. В другом варианте осуществления указанная иммунная эффекторная клетка активируется при связывании иммуноглобулиноподобной молекулы с молекулой-мишенью. Задействование эффекторных механизмов может, например, вызывать перенаправление иммуномодулируемой цитотоксичности путем введения иммуноглобулиноподобной молекулы, полученной способом согласно настоящему изобретению, которая способна связываться с цитотоксической триггерной молекулой, такой как Т-клеточный рецептор или гамма-рецептор Fc, тем самым активируя нижестоящие иммунные эффекторные пути. Термин «иммунная эффекторная клетка» или «эффекторная клетка», используемый в настоящем описании, относится к клетке из естественного репертуара клеток иммунной системы млекопитающих, которая может быть активирована для воздействия на жизнеспособность клетки-мишени. К иммунным эффекторным клеткам относятся клетки лимфоидного происхождения, такие как естественные клетки-киллеры (NK), Т-клетки, включая цитотоксические Т-клетки, или В-клетки, а также клетки миелоидного происхождения могут рассматриваться как иммунные эффекторные клетки, такие как моноциты или макрофаги, дендритные клетки и нейтрофильные гранулоциты. Следовательно, указанная эффекторная клетка предпочтительно представляет собой НК-клетку, Т-клетку, В-клетку, моноцит, макрофаг, дендритную клетку или нейтрофильный гранулоцит.

Таким образом, в одном объекте настоящего изобретения предусматривают способы согласно настоящему изобретению для получения гетеродимерного иммуноглобулиноподобного полипептида, где каждая из полипептидных цепей, содержащих домен СНЗ, дополнительно содержит переменную область, распознающую целевой эпитоп. В одном варианте осуществления настоящего изобретения каждая из 2 переменных областей СНЗ-домена, содержащих

полипептидные цепи, распознает один и тот же целевой эпитоп, но с разной аффинностью. В другом варианте осуществления настоящего изобретения каждая из 2 переменных областей полипептидных цепей, содержащих СНЗ-домен, распознает другой целевой эпитоп. В другом варианте осуществления настоящего изобретения разные целевые эпитопы расположены на одной и той же молекуле-мишени, которая может быть либо связанной с мембраной молекулой, либо растворимой молекулой. В другом варианте осуществления настоящего изобретения разные целевые эпитопы расположены на разных молекулах-мишенях, которые могут экспрессироваться либо в одних и тех же клетках, либо в разных клетках. В другом варианте осуществления настоящего изобретения разные молекулы-мишени могут быть растворимыми молекулами, или одна молекула-мишень может быть растворимой молекулой, тогда как вторая молекула-мишень является молекулой, связанной с мембраной. В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере одна из молекул-мишеней гетеродимерного иммуноглобулиноподобного полипептида расположена на опухолевой клетке. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере одна из молекул-мишеней гетеродимерного Ig-подобного полипептида расположена на эффекторной клетке.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ получения одного или нескольких гетеродимерных иммуноглобулиноподобных полипептидов, где указанные полипептиды представляют собой антитела. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитела относятся к изотипу IgG, IgA, IgD, IgE или IgM. В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитела относятся к изотипу IgG. В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитела относятся к изотипу IgG1.

Кроме того, предложен гетеродимерный иммуноглобулиноподобный полипептид или смесь по меньшей мере двух Ig-подобных полипептидов, которые можно получить способом согласно настоящему изобретению. Указанный гетеродимерный полипептид или смесь полипептидов содержит два домена СНЗ, где один из указанных двух доменов СНЗ содержит варианты аминокислот L351D и L368E, и где другой из указанных двух доменов СНЗ содержит варианты аминокислот T366K и L351K, включая один или несколько

вариантов к последовательности СНЗ дикого типа, которая усиливает гетеродимеризацию и/или дестабилизирует образование гомодимера и предпочтительно обеспечивает комбинацию этих преимуществ, включая вариации в положениях 360, 364 и 409 в соответствии с нумерацией ЕС.

5 Эти варианты аминокислот вызывают предпочтительное спаривание указанных двух доменов СНЗ, как объяснялось ранее. Варианты аминокислот L351D и L368E в одном из указанных двух доменов СНЗ и варианты аминокислот T366K и L351K в другом из указанных двух доменов СНЗ вместе обозначаются в настоящем изобретении «ДЕКК». Домен СНЗ, несущий варианты аминокислот L351D и L368E, также называют «стороной DE», «плечом DE» или «DE», а домен СНЗ, несущий варианты аминокислот T366K и L351K, также называют «стороной КК», «плечом КК» или «КК». Варианты аминокислот, описанные в настоящем изобретении (в положениях K360, S364 и/или K409), могут быть введены отдельно или предпочтительно с другими вариантами для стимулирования гетеродимеризации, более предпочтительно на каркасе DEКК и еще более предпочтительно на стороне DE. В таком случае варианты в положениях аминокислот 360, 364 и 409 способны повышать стабильность гетеродимера и/или дестабилизировать гомодимер.

Также предложена фармацевтическая композиция, содержащая гетеродимерный полипептид, подобный иммуноглобулину, или смесь по меньшей мере двух полипептидов, которые можно получить любым способом согласно настоящему изобретению. В одном варианте осуществления гетеродимерные полипептиды представляют собой антитело/антитела или поливалентные мультимеры. Указанная фармацевтическая композиция может содержать гетеродимерный иммуноглобулиноподобный полипептид или смесь по меньшей мере двух полипептидов, содержащих моноспецифические или биспецифические Ig-подобные молекулы, или комбинацию моноспецифических и биспецифических Ig-подобных полипептидов. Кроме того, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит фармацевтически приемлемый носитель. Используемый в настоящем изобретении термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает растворители, соли, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие всасывание, и т.п., которые являются физиологически совместимыми. В зависимости от способа

введения (например, внутривенно, подкожно, внутрисуставно и т.п.) Ig-подобные полипептиды могут быть покрыты материалом для защиты Ig-подобных полипептидов от действия кислот и других естественных условий, которые могут инактивировать Ig-подобные полипептиды.

5 В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к гетеродимерному антителу, содержащему первую тяжелую цепь с первой СН3-областью IgG человека и вторую тяжелую цепь со второй СН3-областью IgG человека, которая отличается от первой СН3-области IgG человека, где первая СН3-область человека содержит аминокислотный вариант СН3 IgG L351D и  
10 L368E, а вторая СН3-область человека содержит аминокислотный вариант СН3 IgG человека T366K и L351K, при этом первая СН3-область IgG человека содержит дополнительный аминокислотный вариант в положениях K360, S364 или K409. Гетеродимерное антитело предпочтительно содержит одну или несколько легких цепей антитела. Первая и вторая СН3-области IgG человека  
15 предпочтительно представляют собой области IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека. Первая и вторая СН3-области IgG человека предпочтительно представляют собой СН3-области IgG1. Первая тяжелая цепь может содержать переменную область тяжелой цепи, которая отличается от переменной области тяжелой цепи второй тяжелой цепи. Переменные домены антитела,  
20 содержащие разные переменные области тяжелой цепи, связанные с соответствующей легкой цепью, могут связывать разные эпитопы и/или антигены. Первая тяжелая цепь и/или вторая тяжелая цепь могут содержать более одной переменной области. Гетеродимерное антитело, содержащее одну или две тяжелые цепи с более чем одной переменной областью, может  
25 образовывать три или более переменных доменов вместе с соответствующими комплементарными переменными областями. Гетеродимерные антитела с двумя или более переменными доменами, которые связывают разные эпитопы и/или антигены, также называют би-, три-, тетра- и т.д. специфическими антителами. Такие антитела также в совокупности называются  
30 мультиспецифическими антителами.

В целях ясности и краткости описания в настоящем изобретении описывают свойства как часть одного и того же или отдельных вариантов его осуществления, однако следует понимать, что объем изобретения может

включать варианты его осуществления, имеющие комбинации всех или некоторых из описанных признаков.

Настоящее изобретение далее иллюстрируется примерами. Эти примеры никоим образом не ограничивают рамок охвата настоящего изобретения, а служат только для его пояснения.

Если не указано иное, все используемые в настоящем изобретении технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области настоящего изобретения. Кроме того, в настоящем описании относящееся к единственному числу включают ссылки во множественном числе. Если не указано иное, нуклеиновые кислоты записываются слева направо в ориентации от 5' к 3'; аминокислотные последовательности записываются слева направо в амино-карбоксильной ориентации соответственно. Следует понимать, что данное изобретение не ограничивается описанными конкретными методологиями, протоколами и реагентами, поскольку они могут варьироваться в зависимости от контекста, в котором они используются специалистами в данной области.

Объекты настоящего изобретения демонстрируются следующими примерами, которые его не ограничивают.

#### Примеры

##### Пример 1. Прогнозирование *in silico*

Вариант Fc IgG человека, содержащий DEKK (L351D, L368E/L'351K, T'366K), используют в качестве исходной модели. WO 2013/157954; De Nardis с соавт., *J. Biol. Chem.*, 2017, 292(35):14706–14717. Структурные исследования проводят *in silico* для выявления остатков ключевых контактов в на границе раздела CH3 DEKK/DEDE. Эти остатки анализируют с использованием информационно-ориентированного гибкого подхода к моделированию биомолекулярных комплексов High Ambiguity Driven protein-protein DOCKing (HADDOCK; информационный подход к стыковке, который моделирует стыковку биомолекулярных комплексов, например, белков или нуклеиновых кислот) для выявления вариантов, которые существенно снижают образование гомодимеров DEDE, но нет существенного отрицательного столкновения или улучшения стабильности на границе раздела DEKK. Всего для анализа *in vitro* отобрано 18 вариантов CH3 IgG человека, все на фоне DEKK. Каждый из 18 вариантов имел отличающийся от других вариант аминокислоты в одном из

следующих положений в домене CH3 DE IgG человека: K360, S354, S364 или K409.

### Пример 2. Эксперименты SDS-PAGE *in vitro*

Созданы векторы IgG со всеми предложенными вариантами в CH3 в  
 5 дополнение к мутациям L351D, L368E (DE). Для этого создают 18 конструкций.  
 Получение осуществляют с использованием одной тяжелой цепи DE\*, а также  
 комбинированных трансфекций тяжелых цепей DE\* и КК, где «\*» обозначает  
 один из 18 вариантов, упомянутых выше. Конструкции клонируют в  
 10 MG1122C1708 (фиг. 1) с использованием ферментов рестрикции BspEI и AflII.  
 ПЦР колоний/последовательностей проводят на продуктах лигирования, чтобы  
 получить все варианты. Все подтвержденные варианты подвергают мини-  
 обработке с последующим секвенированием для подтверждения идентичности  
 CH2, CH3 и VH. Осуществляют трансфекции отдельных конструкций DE\*  
 (обозначенных PGxxxx IgG) и конструкций DE\* в сочетании с конструкциями  
 15 КК, несущими другой VH (обозначенных биспецифическим IgG PBxxxxxx), в  
 клетки 293FF. После 7 дней инкубации (37°C, 8% CO<sub>2</sub>, 155 об/мин) собирают  
 супернатант клеток с последующей очисткой белком А (кислотная элюция) и  
 заменой буфера на ФСБ с pH 7,4. В результате концентрацию IgG в образцах  
 измеряют в единицах цифровой информации Octet.

### 20 Анализ методом электрофореза белков в полиакриламидном геле (SDS-PAGE)

Все полученные и очищенные IgG анализируют с помощью электрофореза  
 в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в  
 невозстанавливающих условиях (SDS-PAGE). Для получения в каждую лунку  
 25 планшета загружают одинаковое количество образца IgG, обычно 1 мкг (если  
 это невозможно, количество доводят до количества в образце с самой низкой  
 концентрацией). Это позволяет провести прямое сравнение образцов. Гели  
 исследуют на глаз на полное содержание IgG и полутела. Программное  
 обеспечение Chemidoc MP Imager также можно использовать для  
 30 количественного определения относительного количества полного IgG и  
 полутела в каждом геле.

Повышенные количества полутел в одиночных трансфекциях (PGxxxx)  
 указывает на то, что вариант гомодимера нестабилен. Полосы IgG в двойных  
 трансфекциях (PBxxxxxx) подтверждают, что гетеродимер образован.

Варианты DE\*-СНЗ, которые демонстрируют в основном образование полутел при одиночных трансфекциях (по сравнению с контрольным образцом MG4539C1452, содержащим область КК СНЗ) и в основном полный IgG при биспецифических трансфекциях, отбирают для дальнейшей характеристики в последующем исследовании (фиг. 2-4 и табл. 1). Всего три из четырех позиций, идентифицированных *in silico*, имеют улучшенные свойства *in vitro* по сравнению с контрольными образцами (K360, S364 и K409). Всего для дальнейшего изучения отобрано 9 вариантов.

Таблица 1. Сводка результатов, полученных в экспериментах SDS-PAGE. Все они относятся к домену СНЗ, содержащему DE

Варианты	Комментарий	Выбраны для дальнейшего анализа?
K360D	Биспецифичность; на пластине SDS видно меньше полутел (загружено менее 0,6 мкг по сравнению с 0,7 мкг для контроля)	Да
S364V	Больше полутел при получении одиночного продукта по сравнению с исходным DE	Да
S364I	Больше полутел при получении одиночного продукта по сравнению с исходным DE	Да
S364T	Больше полутел при получении одиночного продукта по сравнению с исходным DE	Да
S364Q	Возможно, больше в процессе получения полутел в единичном получении по сравнению с исходным DE	Да
K409I	Больше полутел в единичном получении по сравнению с исходным DE	Да
S364L	Дополнительные полосы видны около стандарта 140/160/> 200 кДа на пластине SDS (выработка единичного продукта)	Да
K409L	Дополнительные полосы, видимые отдельным продуктом на пластине SDS	Да
K409E	Дополнительные полосы, наблюдаемые при одиночной и биспецифической продукции на пластине SDS, немного больше полутел, наблюдаемых при двойной трансфекции	Да

После экспериментов методом SDS-PAGE проведен дополнительный анализ HADDOCK *in silico* для выявления потенциально многообещающих двойных вариантов (табл. 2, строки 10-15), которые можно было бы дополнительно улучшить по сравнению с контролями.

Таблица 2. Сводка по мутантам, отобраным для дальнейшего изучения

№№	DEKK	Результаты эксперимента	
		Контроль	
1	K360D	Меньше полутел при биспецифической продукции	
2	S364I	Больше полутел при одиночной продукции	
3	S364Q	Возможно больше полутел при одиночной продукции	
4	S364T	Больше полутел при одиночной продукции	
5	S364V	Больше полутел при одиночной продукции	
6	S364L	Дополнительные полосы при одиночной продукции	
7	K409I	Больше полутел при одиночной продукции	
8	K409L	Дополнительные полосы при одиночной продукции	
9	K409E	Дополнительные полосы при одиночной продукции	
10	S364I/K360D	Последующие эксперименты, описанные ниже	
11	S364T/K360D	Последующие эксперименты, описанные ниже	
12	S364T/K409E	Последующие эксперименты, описанные ниже	
13	K360D/K409E	Последующие эксперименты, описанные ниже	
14	S364V/K360D	Последующие эксперименты, описанные ниже	
15	S364L/K409L	Последующие эксперименты, описанные ниже	

Таким образом, всего было получено 18 вариантов по 3 позициям в DE-плече СНЗ. Для получения гомодимеров проводили одиночные трансфекции, а для получения биспецифических IgG проводили двойные трансфекции с общим плечом КК. Анализ SDS-PAGE показывает, что 5 вариантов DEKK показывают больше загрязняющих полутел в полученных одно-плечевых по сравнению с контрольным образцом DEKK. Отобраны еще 3 варианта, несмотря на aberrantные результаты SDS-PAGE при одиночном получении из-за результатов для биспецифического IgG в экспериментах по двойной трансфекции. Комбинации хорошо функционирующих мутаций были проанализированы с использованием HADDOCK, и в результате были отобраны 6 дополнительных комбинаций для последующего анализа.

Пример 3. Результаты стабильности и биофизическая характеристика *in vitro*

15 выбранных вариантов получены как биспецифические (CD137 (MF6744 - ранее упоминается в публикациях US 2020/0017595 A1, US 2019/00352401 A2.) x фибриноген (MF1122)) с соотношениями DE:KK, равными 1:1 и 3:1, при этом

DE-плечо подвергают сверхэкспрессии для изучения образования его гомодимера.

IgG дополнительно изучают с использованием методов CIEХ-HPLC (катионообменная высокоэффективная жидкостная хроматография), HP-SEC (высокоэффективная эксклюзионная хроматография) и pMS (нативная масс-спектрометрия). Кроме того, был проведен анализ стабильности с анализом температур плавления и агрегации, соответственно,  $T_m$  и  $T_{agg}$ . Варианты, которые значительно уменьшают образование гомодимера и демонстрируют хорошую стабильность  $F_c$ , о чем свидетельствует высокое значение  $T_m/T_{agg}$ , отбирают для получения белков в больших масштабах.

Используемые VH различаются по массе (масса моноклонального IgG MF1122 144905 и для MF6744 145932 кДа), поэтому гомодимеры и гетеродимеры можно разделить методом pMS. Они различаются по времени задержки CIEХ RT (13,3 мин и 9,7 мин) и поэтому гомо- и гетеродимеры можно разделить методом CIEХ, особенно потому, что могут комбинироваться с КК и DE, соответственно. Fab имеют высокую  $T_m$ . Высокая  $T_m$  Fab позволяет определить температуры плавления ( $T_m$ ) вариантов СНЗ.

Полученные IgG с соотношением ДНК 1:1 анализируют по  $T_m/T_{agg}$  с использованием прибора UNcle (UNchained Labs Product Code 200-1037). Температуру плавления ( $T_m$ ) определяют по изменению собственной флуоресценции аминокислот при повышении температуры (спектральный диапазон 250-720 нм). Температуру агрегирования ( $T_{agg}$ ) определяют путем измерения статического рассеяния света (СРС) одновременно с определением  $T_m$  с использованием лазеров с длинами волн 266 нм и 473 нм и определения рассеянного света под углом  $90^\circ$ . Анализ динамического рассеяния света (ДРС) выполняют с помощью регистрации флуоресценции и СРС (Blue&UV, время экспозиции 1000 мсек, UV266: фильтр 4, Blue473: фильтр 3) с использованием линейного изменения температуры от  $25^\circ\text{C}$  до  $95^\circ\text{C}$  со скоростью  $0,3^\circ\text{C}/\text{мин}$  для определения  $T_m/T_{agg}$ .

Это позволяет определить  $T_m/T_{agg}$  ненапряженных образцов с соотношением КК:DE=1:1. Все образцы имеют концентрацию 300 мкг/мл, как показано в табл. 4.

### Стресс-тесты

Небольшой анализ стабильности проводят путем воздействия на модифицированный IgG, все эти анализы выполняют в ФСБ.

5 Получают три аликвоты по 100 мкл каждого образца при концентрации 300 мкг/мл (как показано в табл. 3).

К образцам применяют следующий стресс:

- 5 × FT (freeze thawing – замораживание-оттаивание) (образцы повторно хранят при -80°C в течение не менее 1 ч с последующим полным оттаиванием при комнатной температуре);

10 - 2 суток при 50°C (пробы помещают в водяную баню или инкубатор при 50°C и инкубируют 2 суток);

- Хранение при 4°C (в качестве контроля отсутствия стресса).

15 Образцы после стрессового воздействия анализируют с помощью ДРС в прямом сравнении с ненапряженными образцами, не подвергавшимися стрессовому воздействию (хранение при 4°C), для определения в образцах агрегатов.

Хотя наблюдались некоторые различия в  $T_m/T_{agg}$  у вариантов, все они проявились как стабильные молекулы (табл. 3 и 4).

Таблица 3. Суммирование данных по результатам динамического рассеяния света (ДРС), ПК1 = пик 1, ПК2 = пик 2, DIM=диаметр

Лунка	Образец	Вариант	50°C				F/T				4°C						
			T(°C)	ПК1 DIM (нм)	ПК1 Масса (%)	ПК2 DIM (нм)	ПК2 Масса (%)	T(°C)	ПК1 DIM (нм)	ПК1 Масса (%)	ПК2 DIM (нм)	ПК2 Масса (%)	T(°C)	ПК1 DIM (нм)	ПК1 Масса (%)	ПК2 DIM (нм)	ПК2 Масса (%)
A1	0,3 мг/млPB31852p33	DE+S364V	24,95	10,72	100	-		24,97	9,53	100			25	9,9	100	-	
B1	0,3 мг/млPB31852p34	DE+S364L	25,05	10,75	100	-		24,97	10,33	100			24,96	9,89	100	-	
C1	0,3 мг/млPB31852p35	DE+S364I	25	11,2	100	-		24,95	10,32	100			24,97	9,89	99,98	94,83	
D1	0,3 мг/млPB31852p36	DE+S364T	24,97	12,13	99,81	60,39	0,19	24,96	10,33	100			25,02	9,91	99,97	94,95	
E1	0,3 мг/млPB31852p37	DE+K409I	25,04	10,35	100	-		24,95	10,72	100			24,98	9,54	99,97	83,28	
F1	0,3 мг/млPB31852p38	DE+K409L	24,97	10,33	100	-		24,99	10,34	100			25	10,34	100	-	
G1	0,3 мг/млPB31852p39	DE+K409E	25,01	11,64	100	-		25,07	10,75	100			24,99	10,34	99,93	60,42	
H1	0,3 мг/млPB31852p40	DE+S354Q	24,97	14,24	100	-		25,02	9,91	100			25	9,9	100	-	
I1	0,3 мг/млPB31852p47	DE+S364T_K409E	24,99	11,2	100	-		24,98	9,54	100			25	9,54	99,97	76,89	
J1	0,3 мг/млPB31852p42	DE+K360D_S364I	24,97	11,19	100	-		25	9,9	100			24,99	9,54	100	-	
K1	0,3 мг/млPB31852p43	DE+K360D_S364T	24,95	10,32	99,92	76,8		24,97	10,33	100			25	10,34	100	-	
L1	0,3 мг/млPB31852p44	DE+K360D_S364V	24,99	10,73	100	-		24,99	9,9	100			24,99	9,54	100	-	
M1	0,3 мг/млPB31852p45	DE+K360D_K409E	25,07	11,66	100	-		25	9,54	100			25	10,34	100	-	
N1	0,3 мг/млPB31852p46	DE+S364L_K409L	24,97	10,72	100	-		25,01	10,34	100			24,99	10,34	100	-	
A2	0,3 мг/млPB31852p47	DE+S364T_K409E	24,98	10,33	100	-		25	9,9	100			24,98	10,33	100	-	
B2	0,3 мг/млPB31852p48	Только DE	24,96	11,19	100	-		24,99	10,34	100			24,99	10,34	100	-	

Таблица 4. Суммирование данных по результатам  $T_m$ , полученных с помощью инструмента UNcle. Следует отметить, что все исследованные образцы имеют PBCode PB31852 в качестве префикса к их уникальному идентификационному номеру (например, p33, p34 и т. д.). Эта номенклатура также сокращена до уникальных идентификационных номеров (например, PB31852p33 сокращена до p33) в разделе примеров, например, в табл. 5 для простоты. Подробную информацию о вариантах аминокислот, соответствующих каждому уникальному идентификатору, можно найти, например, в табл. 3.

Лунки	Образцы	$T_{m1}$ (°C)	$T_{m2}$ (°C)	$T_{m3}$ (°C)	Tagg 266 (°C)
A1	0,3 мг/млPB31852p33_4C	64	74,9		75,19
B1	0,3 мг/млPB31852p34_4C	63	74,9		75,15
C1	0,3 мг/млPB31852p35_4C	64,11	75	83,06	74,56
D1	0,3 мг/млPB31852p36_4C	54,17	65,7	75,06	74,64
E1	0,3 мг/млPB31852p37_4C	65	75,07		74,74
F1	0,3 мг/млPB31852p38_4C	66,03	75		74,8
G1	0,3 мг/млPB31852p39_4C	62,5	75,14		74,84
H1	0,3 мг/млPB31852p40_4C	54,56	64,5	74,59	74,65
I1	0,3 мг/млPB31852p47_4C	62,5	75	93,04	75,13
J1	0,3 мг/млPB31852p42_4C	64,67	75,16		74,82
K1	0,3 мг/млPB31852p43_4C	65,5	75,18	90	74,86
L1	0,3 мг/млPB31852p44_4C	64,24	75,5	83,5	75,51
M1	0,3 мг/млPB31852p45_4C	62,5	76	85,12	75,95
N1	0,3 мг/млPB31852p46_4C	65,08	76	84,5	75,66
A2	0,3 мг/млPB31852p47_4C	64	77,5		77,55
B2	0,3 мг/млPB31852p48_4C (только DE)	67,66	77,5		76,75
O2	0,25 мг/млPG1122p113	72	80,54		81,59

#### 10 HP-SEC (высокоэффективная эксклюзионная хроматография)

Разработанный IgG анализируют с помощью HP-SEC в соответствии со стандартными методами, известными в данной области. В систему ВЭЖХ Agilent серии 1260, Tosoh TSK-gel G3000SWxl кат. № 808541 с защитной колонкой Tosoh TSK SWXL кат. № 808543, рабочий буфер: 200 мМ NaPO<sub>4</sub>, 50 мМ NaCl, pH 7,0, загружают 20 мкг образца. Анализ HP-SEC проводят для обнаружения более мелких агрегатов по сравнению с анализом ДРС (табл. 5) и его осуществляют после 1х цикла замораживания/оттаивания (F/T) для представления образцов, обычно используемых в экспериментах после хранения при -80°C.

Таблица 5. Сводка результатов HP-SEC (где p48 и p64 представляют собой контрольные плечи DE), основной пик представляет биклоны и/или гомодимер IgG, пик с поздним элюированием содержит полутела.

1:1	1:3	Область основного пика % общего количества 1:1	Основной пик 3:1	Пик позднего элюирования % общего количества 1:1	Пик позднего элюирования 3:1
p33	p49	74,82	57,65	25,18	41,63
p34	p50	86,75	77,41	12,19	20,6
p35	p51	79,38	60	20,62	38,87
p36	p52	82,32	68,92	17,68	30,36
p37	p53	75,51	54,53	22,18	44,85
p38	p54	92,7	83,82	5,84	14,94
p39	p55	88,31	81,81	11,16	16,58
p40	p56	91,68	90,54	7,12	7,66
p47	p63	79,21	59,09	20,28	40,26
p42	p58	77,77	54,51	21,48	44,37
p43	p59	80,59	67,75	17,21	31,01
p44	p60	73,86	55,59	24,57	44,11
p45	p61	88,9	85,64	9,07	13,39
p46	p62	94,4	89,18	4,88	9,96
p47	p63	80,98	57,93	18,6	40,85
p48	p64	94,08	87,76	4,42	11,02

5 Стресс-тест показывает, что варианты DEKK достаточно стабильны и проявляют агрегирование только после сильного стресса.

Таблица 6. Сводка результатов HP-SEC после хранения образцов при 4°C

1:1	Вариант	4°C				
		Ранние- ранние агрегаты (%)	Ранние агрегаты (%)	Главный IgG (%)	Позднее полутело (%)	Поздние- поздние фрагменты (%)
p33	DE+S364V		0,55	74,61	24,84	
p34	DE+S364L		0,53	86,81	12,66	
p35	DE+S364I	0,89	0,60	78,09	20,42	
p36	DE+S364T	0,76	0,72	81,05	17,46	
p37	DE+K409I	0,82	0,92	76,42	21,84	
p38	DE+K409L	0,24	0,57	93,23	5,96	
p39	DE+K409E	0,78	0,66	86,74	11,83	
p40	DE+S354Q	0,32	1,02	91,50	7,16	
p47	DE+S364T_K409E		0,52	79,14	20,34	
p42	DE+K360D_S364I		0,35	78,38	21,26	

		4°C				
1:1	Вариант	Ранние-ранние агрегаты (%)	Ранние агрегаты (%)	Главный IgG (%)	Позднее полутело (%)	Поздние-поздние фрагменты (%)
p43	DE+K360D_S364T	0,28	0,63	81,25	17,84	
p44	DE+K360D_S364V	0,69	1,02	73,50	24,79	
p45	DE+K360D_K409E			90,43	9,57	
p46	DE+S364L_K409L	0,29	0,71	93,71	5,29	
p47	DE+S364T_K409E		1,22	80,58	18,20	
p48	Только DE	0,3	1,47	93,46	4,76	

Таблица 7. Сводка результатов HP-SEC после нагревания образцов до 50°C в течение 2 дней.

		50°C				
1:1	Ранние-ранние агрегаты (%)	Ранние агрегаты (%)	Главный IgG (%)	Позднее полутело (%)	Поздние-поздние фрагменты (%)	
p33	1,01 – 7,32 - 4,51		66,07	20,49	0,60	
p34	0,28	7,83	81,13	10,76		
p35	0,37 - 5,76 – 4,18		72,75	16,39	0,54	
p36	0,61	12,63	71,35	15,41		
p37	0,31 – 5,09 – 3,56		71,08	19,53	0,44	
p38	0,37	5,25	88,88	5,50		
p39		14	76,90	9,10		
p40	7,20	22,33	64,57	5,07	0,82	
p47	9,18	6,72	66,44	16,76	0,91	
p42	0,48	7,48	72,40	18,84	0,80	
p43	0,72	7,54	74,55	16,52	0,67	
p44		7,86	68,75	22,44	0,94	
p45		9,81	81,37	7,48	1,34	
p46		4,84	90,43	4,16	0,57	
p47	0,52	11,71	70,80	16,02	0,95	
p48	0,94	3,72	90,12	4,33	0,88	

Таблица 8. Сводка результатов HP-SEC после 5-кратного замораживания-оттаивания образцов.

1:1	Замораживание/оттаивание (5 раз)				
	Ранние-ранние агрегаты (%)	Ранние агрегаты (%)	Главный IgG (%)	Позднее полутело (%)	Поздние-поздние фрагменты (%)
p33	0,60	1,05	73,71	24,64	
p34		0,32	87,59	12,08	
p35	0,57 – 0,70	– 0,33	78,25	20,15	
p36	0,95	1,70	79,88	17,47	
p37	0,68	1,45	76,54	21,33	
p38		1,24	93,24	5,52	
p39		1,34	85,48	11,58	1,60
p40		1,59	91,46	6,95	
p47	0,26	0,56	78,60	20,58	
p42		1,86	75,89	22,25	
p43	0,56	1,40	80,45	17,59	
p44		0,44	74,64	24,92	
p45		1,05	89,82	9,13	
p46		1,03	93,71	5,26	
p47	0,73	0,92	79,73	18,61	
p48	0,36	1,97	93,66	4,01	

СІЕХ-НPLC (катионообменная высокоэффективная жидкостная

5 хроматография)

Полученные IgG анализируют с помощью СІЕХ-НPLC. Система ВЭЖХ серии Agilent 1260, колонка Tosoh TSKgel SP-STAT кат. № 21964, используемые буферы: А) 25 мМ Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, рН 6,0 и Б) 25 мМ Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1М NaCl, рН 6,0, анализ с линейным градиентом 0-30% буфера Б (увеличение 2% Б на мл) при 0,5 мл/мин, 10 загружено 10 мкг образца. Полученные профили анализируют на предмет формы пика, времени удержания, соотношения биспецифических и загрязняющих веществ и разделения между биспецифическими и загрязняющими веществами (особенно в образцах, трансфицированных 3:1). Разделение между PG1122 дикого типа и PG6744 дикого типа составляет ~3,7 мин, которое увеличивается при использовании КК/DE и других вариантов. Контроль DEКК дикого типа 15 показал пик при 10,25 (биклонический) и 7,8 мин (гомодимер DEDE), как и

ожидалось. Соотношения продукции 1:1 или 1:3 имеют почти одинаковые значения времени удержания (ВУ).

Хотя в некоторых образцах обнаружены виды с ранним элюированием, состоящие из гомодимеров DEDE в одном или обоих продуктах, в других образцах не было обнаруживаемых видов с ранним элюированием.

В частности, в варианте S354Q (обе продукции), варианте S364T и WT (продукция 3:1) наблюдалось большое количество видов с ранним элюированием, но во всех других образцах их было <10%. Все образцы показывают предварительный пик. Более крупные предварительные пики наблюдают при продукциях 1:3, что было примерно в 3 раза больше, чем пики, наблюдаемые при продукции 1:1, по сравнению с высотой основного пика. Не основываясь на какой-либо теории, в настоящем изобретении полагают, что частицы полутела DE\* не связываются с колонкой и элюируются в «пред-пике» (мертвый объем колонки) из-за дополнительных отрицательных зарядов, которые присутствуют в некоторых вариантах.

Многие варианты очень успешно предотвращают образование гомодимера, о чем свидетельствует отсутствие ранних элюирующихся пиков.

Таким образом, для 15 из 18 продуцируемых IgG только очень небольшое количество образовалось или отсутствовало количество гомодимеров DEDE в соответствии с данными CIEХ-HPLC, даже при сверхэкспрессии 3:1 (модифицированного) DE-плеча. Это указывает на то, что большинство дополнительных вариантов успешно предотвращают или уменьшают образование гомодимера (табл. 9) по сравнению с контролем DEKK.

Таблица 9. Сводка результатов СІЕХ-НРLС; ВУ = время удержания, отличие заряда = дополнительный (отрицательный) заряд по сравнению с исходной конструкцией DE, незаполненное поле: пики не обнаружены (порог 1%).

Продукция 1:1	Продукция 3:1	Вариант	1:1 % DEDE	3:1 % DEDE	1:1 % DEKK	3:1 % DEKK	Отличие заряда	ВУ биклонического пика 1:1 (мин)	ВУ биклонического пика 3:1 (мин)	Раннее ВУ 1:1 (мин)	Раннее ВУ 3:1 (мин)	Соотношение пре/наивысшего 1:1	Соотношение пре/наивысшего 3:1	Соотношение коэффициентов
PB31852p33	PB31852p49	DE+S364V	<b>2,16</b>	18,98	96,35	79,3	0	10,56	10,54	7,28	7,24	1,41	3,52	2,5
PB31852p34	PB31852p50	DE+S364L	0	0	97,86	96,91	0	10,73	10,72			0,33	0,85	2,6
PB31852p35	PB31852p51	DE+S364I	0	2,7	97,77	94,8	0	10,73	10,71		7,38	0,87	2,91	3,3
PB31852p36	PB31852p52	DE+S364T	11,45	49,57	86,57	48,87	0	10,28	10,3	7,38	7,38	1,11	4,29	3,9
PB31852p37	PB31852p53	DE+K409I	<b>2,59</b>	22,31	95,34	76,39	-1	9,88	9,85	6,63	6,62	1,82	6,85	3,8
PB31852p38	PB31852p54	DE+K409L	<b>1,64</b>	9,76	97,43	89,66	-1	9,84	9,82	7,05	7,05	0,21	0,59	2,8
PB31852p39	PB31852p55	DE+K409E	0	0	99,34	97,81	-2	9,77	9,75			0,45	0,86	1,9
PB31852p40	PB31852p56	DE+S354Q	26,55	62,84	71,78	36,21	0	10,36	10,32	7,14	7,13	0,12	0,18	1,5
PB31852p47	PB31852p63	DE+S364T_K409E	0	0	98,68	98,76	-2	9,8	9,8			1,29	4,11	3,2
PB31852p42	PB31852p58	DE+K360D_S364I	0	<b>2,46</b>	99,05	97,08	-2	9,46	9,46		7,04	1,79	6,26	3,5
PB31852p43	PB31852p59	DE+K360D_S364T	<b>2,38</b>	9,26	96,78	60,3	-2	9,51	9,48	5,9	5,85	1,52	5,67	3,7
PB31852p44	PB31852p60	DE+K360D_S364V	0	<b>4,02</b>	98,40	70,34	-2	9,51	9,51		5,66	2,18	7,19	3,3
PB31852p45	PB31852p61	DE+K360D_K409E	0	0	96,7	97,35	-4	9,25	9,23			0,34	0,72	2,1
PB31852p46	PB31852p62	DE+S364L_K409L	0	0	98,64	98,96	-1	10,18	10,21			0,16	0,52	3,2
PB31852p47	PB31852p63	DE+S364T_K409E	0	0	97,2	97,43	-2	9,79	9,82			1,07	4,35	4,0
PB31852p48	PB31852p64	<b>Только DE</b>	<b>2,27</b>	62,89	95,76	34,66	0	10,25	10,24	7,8	7,76	0,10	0,39	3,8

<b>Гомодимеры DEDE не обнаружены</b>
<i>Маленький пик гомодимера (0-5%)</i>
<i>Существенный пик гомодимера (5-25%)</i>
<b>Большой пик гомодимера (&gt;25%)</b>

### Электрофорез LabCHIP

Для определения количества IgG (DEKK + DEDE) и полутела в образцах применяют систему электрофореза биклональных продуктов LabChip. Perkin Elmer LabChip GXII Touch HT с использованием набора реагентов Protein Clear HR Reagent (кат. № CLS960014) и Protein Express Assay LabChip (кат. № 760499), анализ в соответствии с инструкциями производителя, концентрация образца 0,3 мкг/мл. Замечено, что формирование полутел DE значительно различается между вариантами и что продукция 3:1 содержит больше полутел DE, как и ожидалось (табл. 10).

10 Таблица 10. Сводка результатов по данным LabChip

1:1	3:1	Вариант	1:1 IgG (%)	1:1 полутело (%)	3:1 IgG (%)	3:1 полутело (%)	Соотношение полутела
p33	p49	DE+S364V	77,1	22,9	44,1	38,28	1,67
p34	p50	DE+S364L	91,1	8,9	21,5	20,16	2,27
p35	p51	DE+S364I	83,4	16,6	41,2	33,3	2,01
p36	p52	DE+S364T	86,5	13,5	30	27,78	2,06
p37	p53	DE+K409I	82,6	17,4	48,9	42,78	2,46
p38	p54	DE+K409L	96,9	3,1	12,6	10,85	3,50
p39	p55	DE+K409E	91,7	8,3	14,4	14,31	1,72
p40	p56	DE+S354Q	95,8	4,2	5,7	6,36	1,51
p47	p63	DE+S364T_K409E	82,2	17,8	43,9	37,44	2,10
p42	p58	DE+K360D_S364I	82,2	17,8	47,3	35,3	1,98
p43	p59	DE+K360D_S364T	86,1	13,9	29,8	22,62	1,63
p44	p60	DE+K360D_S364V	78,7	21,3	45,2	41,84	1,96
p45	p61	DE+K360D_K409E	93,1	6,9	10,5	12,5	1,81
p46	p62	DE+S364L_K409L	97	3	8,1	20,87	6,96
p47	p63	DE+S364T_K409E	83,3	16,7	43,1	39,42	2,36
p48	p64	Только DE	100	0	7.9	8.51	Нет данных

### pMS (нативная масс-спектрометрия)

Все полученные IgG в количестве 100 мкг/образец анализируют в анализе pMS (см. методологию в публикации Rosati с соавт., *Anal Chem.*, 2012 Aug 21;84(16):7227-32). Изучены относительные соотношения между различными видами (биспецифические, гомодимеры, полутела).

Все 16 образцов успешно проанализированы, и с помощью этого метода виды IgG удалось идентифицировать. Контрольный образец DEKK в результате на 95% биспецифичен при продукции 1:1. Процент образования гетеродимеров

вариантов DEKK при продукции 1:1 варьирует от 74% до 100%. Всего 12 образцов содержат >90% гетеродимера DEKK. Образование гомодимера значительно снижено в 14 образцах по сравнению с контролем DEKK. У 8 образцов образовалось  $\leq 2\%$  гомодимеров DEDE при продукции 3:1.

- 5 Таким образом, 14 вариантов значительно снижали образование гомодимера при продуцировании 3:1 (по сравнению с контролем DEKK), а для 8 вариантов гомодимер почти не образовывался (табл. 11).

Таблица 11. Сводка результатов по данным nMS

Продукция 1:1	Продукция 3:1	Вариант	1:1 DEKK (% от общего количества)	3:1 DEKK (% от общего количества)	1:1 DEDE (% от общего количества)	3:1 DEDE (% от общего количества)	1:1 DE (% от общего количества)	3:1 DE (% от общего количества)
PB31852p33	PB31852p49	DE+S364V	85	57	4	9	10	34
PB31852p34	PB31852p50	DE+S364L	98	93	2	2	0	5
PB31852p35	PB31852p51	DE+S364I	93	82	1	2	6	16
PB31852p36	PB31852p52	DE+S364T	85	51	7	31	8	18
PB31852p37	PB31852p53	DE+K409I	87	59	2	7	11	34
PB31852p38	PB31852p54	DE+K409L	93	93	7	2	0	5
PB31852p39	PB31852p55	DE+K409E	99	97	1	1	0	2
PB31852p40	PB31852p56	DE+S354Q	74	44	26	55	0	1
PB31852p47	PB31852p63	DE+S364T_K409E	90	78	2	1	8	22
PB31852p42	PB31852p58	DE+K360D_S364I	92	61	2	5	6	34
PB31852p43	PB31852p59	DE+K360D_S364T	83	46	8	20	9	34
PB31852p44	PB31852p60	DE+K360D_S364V	83	62	5	5	12	34
PB31852p45	PB31852p61	DE+K360D_K409E	99	94	1	1	0	5
PB31852p46	PB31852p62	DE+S364L_K409L	100	96	0	2	0	2
PB31852p47	PB31852p63	DE+S364T_K409E	95	79	0	2	5	20
PB31852p48	PB31852p64	Только DE	95	42	5	56	0	2

**% DEDE: Отсутствует/слабо выявляемый пик (~≤ 5%)**

% DEDE: Четко выявляемый пик (~5-10 %)

% DEDE: Существенный пик (10-25%)

% DEDE: Существенный/большой пик (~ >25%)

### Суммирование результатов

Для обнаружения полутел используют различные методы: LabChip, HP-SEC и nMS. Хотя полученные значения различаются в абсолютном выражении, а nMS обнаруживает меньше полутел, чем другие методы, окончательный вывод о полезности вариантов для снижения образования гомодимера DEDE был последовательным (табл. 12). Для характеристики образцов на наличие DEKK, примесей и агрегатов, происходящих из IgG, используют разные методы, и хотя значения различаются в абсолютном выражении, из полученных данных возможно сделать согласованные выводы (табл. 13-15).

10 Таблица 12. Обзор определения формирования полутел различными экспериментальными методами

Вариант	LabChip % полутел 3:1	HP-SEC % полутел 3:1	nMS ~% полутел 3:1
DE+S364V	38,28	41,63	27,7
DE+S364L	20,16	20,6	16,8
DE+S364I	33,3	38,87	25,0
DE+S364T	27,78	30,36	21,7
DE+K409I	42,78	44,85	30,0
DE+K409L	10,85	14,94	9,8
DE+K409E	14,31	16,58	12,5
DE+S354Q	6,36	7,66	6,0
DE+S364T_K409E	37,44	40,26	27,2
DE+K360D_S364I	35,3	44,37	26,1
DE+K360D_S364T	22,62	31,01	18,4
DE+K360D_S364V	41,84	44,11	29,5
DE+K360D_K409E	12,5	13,39	11,1
DE+S364L_K409L	20,87	9,96	17,3
DE+S364T_K409E	39,42	40,85	28,3
Только DE	8,51	11,02	7,8

Таблица 13. Обзор формирования гомодимеров, определенных методами CIEХ и nMS

1:1	1:3	Вариант	1:1 % DEKK (nMS)	1:1 % DEKK (CIEХ)	3:1 % DEKK (nMS)	3:1 % DEKK (CIEХ)
p33	p49	DE+S364V	85	96,35	57	79,3
p34	p50	DE+S364L	98	97,86	93	96,91
p35	p51	DE+S364I	93	97,77	82	94,8
p36	p52	DE+S364T	85	86,57	51	48,87
p37	p53	DE+K409I	87	95,34	59	76,39

1:1	1:3	Вариант	1:1 % DEKK (nMS)	1:1 % DEKK (CIEX)	3:1 % DEKK (nMS)	3:1 % DEKK (CIEX)
p38	p54	DE+K409L	93	97,43	93	89,66
p39	p55	DE+K409E	99	99,34	97	97,81
p40	p56	DE+S354Q	74	71,78	44	36,21
p47	p63	DE+S364T_K409E	90	98,68	78	98,76
p42	p58	DE+K360D_S364I	92	99,05	61	97,08
p43	p59	DE+K360D_S364T	83	96,78	46	60,3
p44	p60	DE+K360D_S364V	83	98,40	62	70,34
p45	p61	DE+K360D_K409E	99	96,7	94	97,35
p46	p62	DE+S364L_K409L	100	98,64	96	98,96
p47	p63	DE+S364T_K409E	95	97,2	79	97,43
<b>p48</b>	<b>p64</b>	<b>Только DE</b>	<b>95</b>	<b>95,76</b>	<b>42</b>	<b>34,66</b>

Таблица 14. Обзор формирования гомодимеров, определенных методами CIEX и nMS

	1:1	1:3	%DEDE в прод. 1:1 (CIEX-HPLC)	%DEDE в прод. 1:1 (nMS)	%DEDE в прод. 3:1 (CIEX- HPLC)	%DEDE в прод. 3:1 (nMS)
DE+S364V	p33	p49	2,2	4	19,0	9
DE+S364L	p34	p50	0,0	2	0,0	2
DE+S364I	p35	p51	0,0	1	2,7	2
DE+S364T	p36	p52	11,5	7	49,6	31
DE+K409I	p37	p53	2,6	2	22,3	7
DE+K409L	p38	p54	1,6	7	9,8	2
DE+K409E	p39	p55	0,0	1	0,0	1
DE+S354Q	p40	p56	26,6	26	62,8	55
DE+S364T_K409E	p47	p63	0,0	2	0,0	1
DE+K360D_S364I	p42	p58	0,0	2	2,5	5
DE+K360D_S364T	p43	p59	2,4	8	9,3	20
DE+K360D_S364V	p44	p60	0,0	5	4,0	5
DE+K360D_K409E	p45	p61	0,0	1	0,0	1
DE+S364L_K409L	p46	p62	0,0	0	0,0	2
DE+S364T_K409E	p47	p63	0,0	0	0,0	2
Только DE	p48	p64	2,3	5	62,9	56

Нет гомодимерного пика	Отсутствует/ слабо различимый пик	Нет гомодимерного пика	Отсутствует/ слабо различимый пик
Гомодимерный пик 0-5%	Выявляемый пик (~5-10%)	Гомодимерный пик 0-5%	Выявляемый пик (~5-10%)
Гомодимерный пик 5-25%	Значительный пик (~10-25%)	Гомодимерный пик 5-25%	Значительный пик (~10-25%)
Гомодимерный пик > 25%	Большой пик (>25%)	Гомодимерный пик > 25%	Большой пик (>25%)

Таблица 15. Обзор данных по стабильности, полученных методами DLS и HP-SEC

Вариант	1:1	1:3	TM (Uncle, 1:1 продукция)	DLS (Uncle, образцы после стресса)	HP-SEC (1:1, 1x FT агрегаты)	HP-SEC 2й @50C (% агрегаты)	HP-SEC, 5x FT (% агрегаты)
DE+S364V	p3 3	p4 9	64,0	Обнаружено агрегирование/ фрагменты (только интенсивность)	0	12,8	1,7
DE+S364L	p3 4	p5 0	63,0	Нет агрегации	0	8,1	0,3
DE+S364I	p3 5	p5 1	64,1	Нет агрегации	0	10,3	1,6
DE+S364T	p3 6	p5 2	<b>65,7</b>	Обнаружено агрегирование/ фрагменты (только интенсивность)	0	13,2	2,7
DE+K409I	p3 7	p5 3	65,0	Нет агрегации	2,3	9,0	2,1
DE+K409L	p3 8	p5 4	66,0	Нет агрегации	0,5	5,6	1,2
DE+K409E	p3 9	p5 5	62,5	Нет агрегации	0,5	14,0	1,3
DE+S354Q	p4 0	p5 6	<b>64,5</b>	Нет агрегации	1,2	29,5	1,6
DE+S364T_K409 E	p4 7	p6 3	62,5	Нет агрегации	0,5	15,9	0,8
DE+K360D_S36 4I	p4 2	p5 8	64,7	Нет агрегации	0,8	8,0	1,9
DE+K360D_S36 4T	p4 3	p5 9	65,5	Обнаружено агрегирование/ фрагменты (только интенсивность)	2,2	8,3	2,0
DE+K360D_S36 4V	p4 4	p6 0	64,2	Нет агрегации	1,6	7,9	0,4
DE+K360D_K40 9E	p4 5	p6 1	62,5	Нет агрегации	2,0	9,8	1,1
DE+S364L_K409 L	p4 6	p6 2	65,1	Нет агрегации	0,7	4,8	1,0
DE+S364T_K409 E	p4 7	p6 3	64,0	Нет агрегации	0,4	12,2	1,7
<b>Только DE</b>	<b>p4 8</b>	<b>p6 4</b>	<b>67,7</b>	Нет агрегации	1,5	4,7	2,3

5 Таким образом, представленные варианты повышают стабильность гетеродимера и снижают образование гомодимера на основе вариаций на поверхности раздела СН<sub>3</sub> гетеродимерного полипептида.

Пример 4

Далее исследуют влияние вариантов, перечисленных в табл. 16, на образование гетеродимера DEKK с точки зрения выхода, чистоты и образования примесей DE, если таковые имеются. В этом конкретном примере

5 биспецифические белки, несущие варианты в тяжелой цепи DE, получены вместе с тяжелой цепью, содержащей KK, в различных соотношениях DE:KK, как указано, очищены с использованием белка А и проанализированы с помощью методов CIEХ и LabChip/SDS-PAGE.

Клонирование

10 Последовательности VH для анти-ТТ на стороне DE и анти-CD3 на стороне KK клонируют с использованием SfiI и XhoI в векторах, содержащих следующие варианты: K360D\_K409E (SEQ ID NO: 12), S364L\_K409L (SEQ ID NO: 14), S364L (SEQ ID NO: 2) и S364T\_K409E (SEQ ID NO: 13)). ПЦР

15 колоний/последовательностей осуществляют на продуктах лигирования, чтобы извлечь все варианты. Все подтвержденные варианты подвергают мини-обработке с последующим секвенированием. IgG продуцируют путем трансфекции отдельных конструкций DE\* (обозначенных PGxxxx IgG) и конструкций DE\*, объединенных с конструкциями KK (обозначенных биспецифическим IgG PBxxxxx) при различных соотношениях DE:KK (табл. 16)

20 в клетки 293FF. После 7 дней инкубации (37°C, 8% CO<sub>2</sub>, 155 об/мин) собирают клеточный супернатант с последующей очисткой белка А (кислотная элюция) и заменой буфера на ФСБ pH 7,4. Концентрацию IgG в образцах измеряют. Затем белки были охарактеризовывают с помощью HP-SEC, CIEХ и Lab-Chip/SDS-PAGE.

25 Таблица 16. Выработка биспецифических и отдельных плечей в 24-луночном формате

№№	Вариант	Соотношение DE:KK
1	DEKK	
2	DEKK	2:1
3	DEKK	1:1
4	DEKK	1:2
5	DEKK	
6	K360D K409E	
7	K360D K409E	2:1
8	K360D K409E	1:1
9	K360D K409E	1:2
10	S364L K409L	

№№	Вариант	Соотношение DE:KK
11	S364L K409L	2:1
12	S364L K409L	1:1
13	S364L K409L	1:2
14	S364L	
15	S364L	2:1
16	S364L	1:1
17	S364L	1:2
18	S364T K409E	
19	S364T K409E	2:1
20	S364T K409E	1:1
21	S364T K409E	1:2

### HP-SEC (высокоэффективная эксклюзионная хроматография)

5 Продукция одного плеча проанализирована с помощью HP-SEC в соответствии с протоколом, описанным в примере 3. Использовали одинаковое количество каждого IgG, но не менее 10 мкг. Для всех вариантов плечо DE представляет собой > 75% полутела, ~ 10-20% гомодимера и некоторых агрегатов в нативных условиях (табл. 17).

Таблица 17. Анализ методом HP-SEC продукции одного плеча

Вариант	HP-SEC %		
	Полутело	Гомодимер	Агрегат
WT-DE	8,8	88,9	2,2
S364T K409E	75,6	23,5	0,9
K360D K409E	76,0	23,3	0,6
S364L	81,4	16,6	2,0
S364L K409L	85,9	12,5	1,6

### 10 Анализ методом CIEХ (катионообменной хроматографии):

Белки IgG анализируют с помощью метода CIEХ (протокол, описанный в примере 3). В качестве контроля проанализированы продукты одного плеча, чтобы можно было определить обнаруженные пики в биспецифических образцах. Количество вводимого белка корректируют для всех образцов.

15 Количество белка в образцах, содержащих одно плечо, доводят до 5 мкг для каждого образца. Максимально возможный объем (100 мкл) вводят в случае слишком низких концентраций. Ожидаемое время удержания (ВУ) гомодимера WT-DE с тяжелой цепью анти-ТТ (VH; SEQ ID NO: 16) составляет 13 мин; ВУ полутела КК с тяжелой цепью анти-CD3 (VH; SEQ ID NO: 17) составляет 26

20 мин. Время удержания димера КК-КК таково, что он элюируется слишком

поздно, чтобы его можно было обнаружить. Пред-пик не учитывался при количественном определении компонентов в образцах. Пики, принадлежащие одному и тому же виду (PB, DE или KK), суммируют и добавляют как одно значение. Состав образца, элюируемого с колонки CIEХ, основан на процентной доле площади каждого пика.

Чистота гетеродимеров улучшилась для всех исследованных вариантов в тестируемых условиях при сравнении одинаковых соотношений (табл. 18). Эффект изменения соотношения DE:KK был таким, что увеличение ДНК KK и, таким образом, усиление трансляции полипептида KK, приводит к уменьшению примеси DE.

Таблица 18. Анализ CIEХ продукции одного плеча

Вариант	Соотношение DE:KK	%PB	%DE	%KK
DEKK	2:1	64	36	0
	1:1	76	17	7
	1:2	73	7	20
K360D K409E	2:1	92	0	8
	1:1	75	0	24
	1:2	59	0	40
S364L K409L	2:1	95	0	5
	1:1	86	0	14
	1:2	58	0	40
S364L	2:1	88	0	12
	1:1	73	0	27
	1:2	53	0	46
S364T K409E	2:1	92	0	8
	1:1	77	0	22
	1:2	54	0	46

В продукции одного плеча гомодимер DEDE варианта уменьшился, а полутело DE увеличилось (табл. 19). Результаты согласуются с данными, полученными с помощью HP-SEC.

Таблица 19. Анализ LabChip/SDS-PAGE продукции одного плеча

CH3	Образец	Вариант	Полутело	Гомодимер
DE	PG1516p47	Исходный	11,7	88,3
DE	PG1516p46	S364T K409E	82,2	17,8
DE	PG1516p43	K360D K409E	83,9	16,1
DE	PG1516p45	S364L	89,2	10,8
DE	PG1516p44	S364L K409L	91,8	8,2
KK	PG3896p12	Исходный	100	0

Влияние вариантов на чистоту

Количество биспецифического белка, присутствующего в каждом образце, оценивают с использованием результатов анализа методом СІЕХ, чтобы получить представление о чистоте биспецифических белков. Чистота гетеродимерного белка РВ улучшена в этом примере, который включает очистку белком А. Чистоту улучшают путем повышения соотношения DE:КК (табл. 20)

Таблица 20. Влияние исследованных вариантов на чистоту

Вариант	Соотношение DE:КК	%РВ	%DE	%КК
DEКК	2:1	64	36	0
	1:1	76	17	7
	1:2	73	7	20
K360D K409E	2:1	92	0	8
	1:1	75	0	24
	1:2	59	0	40
S364L K409L	2:1	95	0	5
	1:1	86	0	14
	1:2	58	0	40
S364L	2:1	88	0	12
	1:1	73	0	27
	1:2	53	0	46
S364T K409E	2:1	92	0	8
	1:1	77	0	22
	1:2	54	0	46

## Использованы последовательности:

10 >MV1708\_DE\_S364V [SEQ ID NO: 1]  
TCCGGAACCTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC  
CGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT  
ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG  
TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTTTCG  
15 AACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG  
TGTACACCGACCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCGTCCTGACCTGCGAGGTCAAAGG  
CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCAG  
CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC  
AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT  
20 CTCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTTTAAACGGATCTTAATTAATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTAAG

>MV1708\_DE\_S364L [SEQ ID NO: 2]  
TCCGGAACCTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC  
CGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT  
25 ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG  
TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTTTCG

AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG  
TGTACACCGACCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCTCCTGACCTGCGAGGTCAAAGG  
CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACG  
CCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC  
5 AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT  
CTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTTTAAACGGATCTTAATTAATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTAAG

>MV1708\_DE\_S364I [SEQ ID NO: 3]

10 TCCGGAATCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC  
CGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT  
ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG  
TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTTTCG  
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG  
15 TGTACACCGACCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCTCCTGACCTGCGAGGTCAAAGG  
CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACG  
CCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC  
AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT  
CTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTTTAAACGGATCTTAATTAATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTAAG

20 >MV1708\_DE\_S364T [SEQ ID NO: 4]

TCCGGAATCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC  
CGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT  
ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG  
TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTTTCG  
25 AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG  
TGTACACCGACCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAACTGACCTGCGAGGTCAAAGG  
CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACG  
CCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC  
AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT  
30 CTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTTTAAACGGATCTTAATTAATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTAAG

>MV1708\_DE\_S364Q [SEQ ID NO: 5]

35 TCCGGAATCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC  
CGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT  
ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG  
TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTTTCG  
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG  
TGTACACCGACCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCCAGCTGACCTGCGAGGTCAAAGG  
CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACG  
40 CCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC

AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT  
CTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTTTAAACGGATCTTAATTAATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTAAG

>MV1708\_DE\_K409I [SEQ ID NO: 6]

5 TCCGGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC  
CGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT  
ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG  
TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTTTCG  
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG  
10 TGTACACCGACCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCGAGGTCAAAGG  
CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAG  
CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCATCCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC  
AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT  
CTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTTTAAACGGATCTTAATTAATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTAAG

15

>MV1708\_DE\_K409L [SEQ ID NO: 7]

TCCGGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC  
CGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT  
ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG  
20 TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTTTCG  
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG  
TGTACACCGACCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCGAGGTCAAAGG  
CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAG  
CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCCTGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC  
25 AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT  
CTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTTTAAACGGATCTTAATTAATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTAAG

>MV1708\_DE\_K409E [SEQ ID NO: 8]

TCCGGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC  
30 CGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT  
ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG  
TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTTTCG  
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG  
TGTACACCGACCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCGAGGTCAAAGG  
35 CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAG  
CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCCTGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC  
AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT  
CTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTTTAAACGGATCTTAATTAATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTAAG

40 >CH2-3\_DE\_K360D-S364I [SEQ ID NO: 9]

Tccggaactcctggggggaccgtcagtccttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcc  
cggaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggt  
acgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccg  
tgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtttcg  
5 aaaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacagg  
tgtacaccgaccccccatcccgggaggagatgaccgacaaccagggtcatcctgacctgagaggtcaaagg  
cttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacg  
cctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctatagcaagctcacctggacaagagcaggtggc  
agcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcct  
10 ctccctgtctccgggtaaatgagtttaacggatcttaattaatccgagctcgggtaccaagcttaag

>CH2-3\_DE\_K360D-S364T [SEQ ID NO: 10]

Tccggaactcctggggggaccgtcagtccttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcc  
cggaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggt  
15 acgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccg  
tgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtttcg  
aaaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacagg  
tgtacaccgaccccccatcccgggaggagatgaccaagaaccagggtcctcctgacctgagaggtcaaagg  
cttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacg  
20 cctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctatagcctgctcacctggacaagagcaggtggc  
agcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcct  
ctccctgtctccgggtaaatgagtttaacggatcttaattaatccgagctcgggtaccaagcttaag

>CH2-3\_DE\_K360D-S364V [SEQ ID NO: 11]

Tccggaactcctggggggaccgtcagtccttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcc  
cggaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggt  
25 acgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccg  
tgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtttcg  
aaaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacagg  
tgtacaccgaccccccatcccgggaggagatgaccaagaaccagggtcctcctgacctgagaggtcaaagg  
30 cttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacg  
cctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctatagcctgctcacctggacaagagcaggtggc  
agcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcct  
ctccctgtctccgggtaaatgagtttaacggatcttaattaatccgagctcgggtaccaagcttaag

35

>CH2-3\_DE\_K360D-K409E [SEQ ID NO: 12]

Ccggaactcctggggggaccgtcagtccttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctccc  
ggaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggta  
cgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgt  
40 gtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtttcga  
aaaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacagg

gtacaccgaccccccatcccgggaggagatgaccgacaaccagggtcagcctgacctgaggtcaaaggc  
 ttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgc  
 ctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctatagcgagctcacccgtggacaagagcaggtggca  
 gcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctc  
 5 tccctgtctccgggtaaatagagtttaacggatcttaattaatccgagctcgggtaccaagcttaag

>CH2-3\_DE\_S364T-K409E [SEQ ID NO: 13]

tccggaactcctggggggaccgtcagttcttcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcc  
 cggacccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggt  
 10 acgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcagctaccg  
 tgtggtcagcgtcctcacccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtttcg  
 aaaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacagg  
 tgtacaccgaccccccatcccgggaggagatgaccaagaaccagggtcacactgacctgaggtcaaagg  
 cttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacg  
 15 cctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctatagcgagctcacccgtggacaagagcaggtggc  
 agcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcct  
 ctccctgtctccgggtaaatagagtttaacggatcttaattaatccgagctcgggtaccaagcttaag

>CH2-3\_DE\_S364L-K409L [SEQ ID NO: 14]

tccggaactcctggggggaccgtcagttcttcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcc  
 cggacccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggt  
 20 acgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcagctaccg  
 tgtggtcagcgtcctcacccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtttcg  
 aaaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacagg  
 tgtacaccgaccccccatcccgggaggagatgaccaagaaccagggtcctcctgacctgaggtcaaagg  
 25 cttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacg  
 cctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctatagcctgctcacccgtggacaagagcaggtggc  
 agcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcct  
 ctccctgtctccgggtaaatagagtttaacggatcttaattaatccgagctcgggtaccaagcttaag

30

>MV1708\_DE\_K360D [SEQ ID NO: 15]

TCCGGAACCTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC  
 CGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT  
 ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG  
 35 TGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTTTCG  
 AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG  
 TGTACACCGACCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCGACAACCAGGTGAGCCTGACCTGCGAGGTCAAAGG  
 CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAACAACACTACAAGACCACG  
 CCTCCCCTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC  
 40 AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCCTACACGCAGAAGAGCCT  
 CTCCTGTCTCCGGGTAATGAGTTTAACGGATCTTAATTAATCCGAGCTCAGGTACCAAGCTTAAG

>VH последовательность анти-TT Fab [SEQ ID NO: 16]  
EVQLVETGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSQYAMHWVRQAPGKGLEWVAIIISHDERNKYYVDSGMGRFTI  
SRDNSKNTLFLQMNSLRSEDTAVYYCARDMRKGGYYYGFDVWGQGTTVTVSS

5

>VH последовательность анти-CD3 Fab [SEQ ID NO: 17]  
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYSGSKKNYADSVKGRFTI  
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTGYNWFDPWGQGTTLVTVSS

10           Внимание читателя обращено на все статьи и документы, которые были  
поданы одновременно с настоящим описанием или до него в связи с настоящей  
заявкой и которые открыты для публичного ознакомления с настоящим  
описанием, причем содержание всех документов включено в настоящее  
описание посредством ссылки.

15           Все характеристики, раскрытые в настоящем описании (включая любые  
сопроводительные пункты формулы изобретения, реферат и фигуры), и/или все  
стадии любого способа или процесса, описанные таким образом, могут быть  
объединены в любую комбинацию, за исключением комбинаций, в которых по  
крайней мере некоторые из таких признаков и/или шаги являются

20           взаимоисключающими.

          Каждая функция, представленная в настоящем описании (включая любые  
прилагаемые пункты формулы изобретения, реферат и фигуры), может быть  
заменена альтернативными функциями, служащими той же, эквивалентной или  
аналогичной цели, если прямо не указано иное. Таким образом, если прямо не  
25           указано иное, каждое описанное свойство является лишь одним примером  
обычной серии эквивалентных или подобных свойств.

          Настоящее изобретение не ограничивается деталями любых приведенных  
выше вариантов его осуществления. Настоящее изобретение распространяется  
на любой новый элемент или любую новую комбинацию свойств,  
30           представленных в настоящем описании (включая любые прилагаемые пункты  
формулы изобретения, реферат и фигуры), или на любой новый элемент или  
любую новую комбинацию стадий любого описанного способа или процесса.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный гетеродимерный белок, который содержит первый полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, и второй полипептид, содержащий  
5 СНЗ IgG человека, где указанный первый полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, включает аминокислотные варианты L351D и L368E, а указанный второй полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, включает аминокислотные варианты T366K и L351K, причем первый полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, включает дополнительный аминокислотный вариант в положении  
10 S364, K409 и/или K360.

2. Выделенный гетеродимерный белок по п. 1, к котором  
а) в положении 364 аминокислотой является валин, изолейцин, треонин, глутамин или лейцин; и/или  
15 б) в положении 409 аминокислотой является изолейцин, лейцин или глутамат; и/или  
в) в положении 360 аминокислотой является аспартат.

3. Выделенный гетеродимерный белок по п.п. 1 или 2, в котором указанный  
20 гетеродимерный белок содержит СНЗ-область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

4. Выделенный гетеродимерный белок по любому из п.п. 1-3, в котором указанный гетеродимерный белок содержит Fc-область иммуноглобулина  
25 человека, причем необязательно Fc-область иммуноглобулина человека содержит Fc-область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

5. Выделенный гетеродимерный белок по любому из п.п. 1-4, в котором  
а) первый полипептид, содержащий СНЗ, представляет собой тяжелую цепь  
30 антитела; и/или  
б) второй полипептид, содержащий СНЗ, представляет собой тяжелую цепь антитела; и/или  
в) гетеродимерный белок дополнительно содержит одну или несколько легких цепей антитела; и/или

г) легкая цепь антитела представляет собой обычную легкую цепь антитела.

6. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенный гетеродимерный белок по любому из п.п. 1-5.

5

7. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая первый и второй полипептиды, содержащие СНЗ IgG человека, по любому из п.п. 1-5.

8. Рекombинантная клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по п. 7.

10

9. Способ получения выделенного гетеродимерного белка по п.п. 1-5, включающий культивирование рекombинантной клетки-хозяина по п. 8 в условиях, обеспечивающих экспрессию первого и второго полипептидов, содержащих СНЗ IgG человека.

15

10. Способ улучшения стабильности гетеродимерного белка, который содержит первый полипептид, содержащий СНЗ-область IgG человека, которая включает аминокислотные варианты L351D и L368E, и второй полипептид, содержащий СНЗ-область IgG человека, которая включает аминокислотные варианты T366K и L351K, причем способ включает введение аминокислотного варианта в первый полипептид, содержащий СНЗ-область IgG человека, в положение S364, K409 и/или K360.

20

11. Способ снижения стабильности гомодимерного белка, который содержит первый полипептид, содержащий СНЗ-область IgG человека, которая включает варианты аминокислот L351D и L368E, причем способ включает введение варианта аминокислоты в первый полипептид, содержащий СНЗ-область IgG человека, в положение S364, K409 и/или K360.

25

30

12. Способ повышения выхода гетеродимерного белка, который содержит первый полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, и второй полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, где указанный первый полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, включает аминокислотный вариант L351D и L368E, и

указанный второй полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, включает аминокислотный вариант Т366К и L351К, включающий введение аминокислотного варианта в первый полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, в положения S364, K409 и/или K360.

5

13. Способ повышения чистоты гетеродимерного белка, который содержит первый полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, и второй полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, где указанный первый полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, включает аминокислотный вариант L351D и L368E, и

10 указанный второй полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, включает аминокислотный вариант Т366К и L351К, включающий (а) введение аминокислотного варианта в первый полипептид, содержащий СНЗ IgG человека, в положения S364, K409 и/или K360; и (б) обработку гетеродимерного белка ионообменной хроматографией.

15

14. Способ по любому из п.п. 10-13, **отличающийся тем**, что:

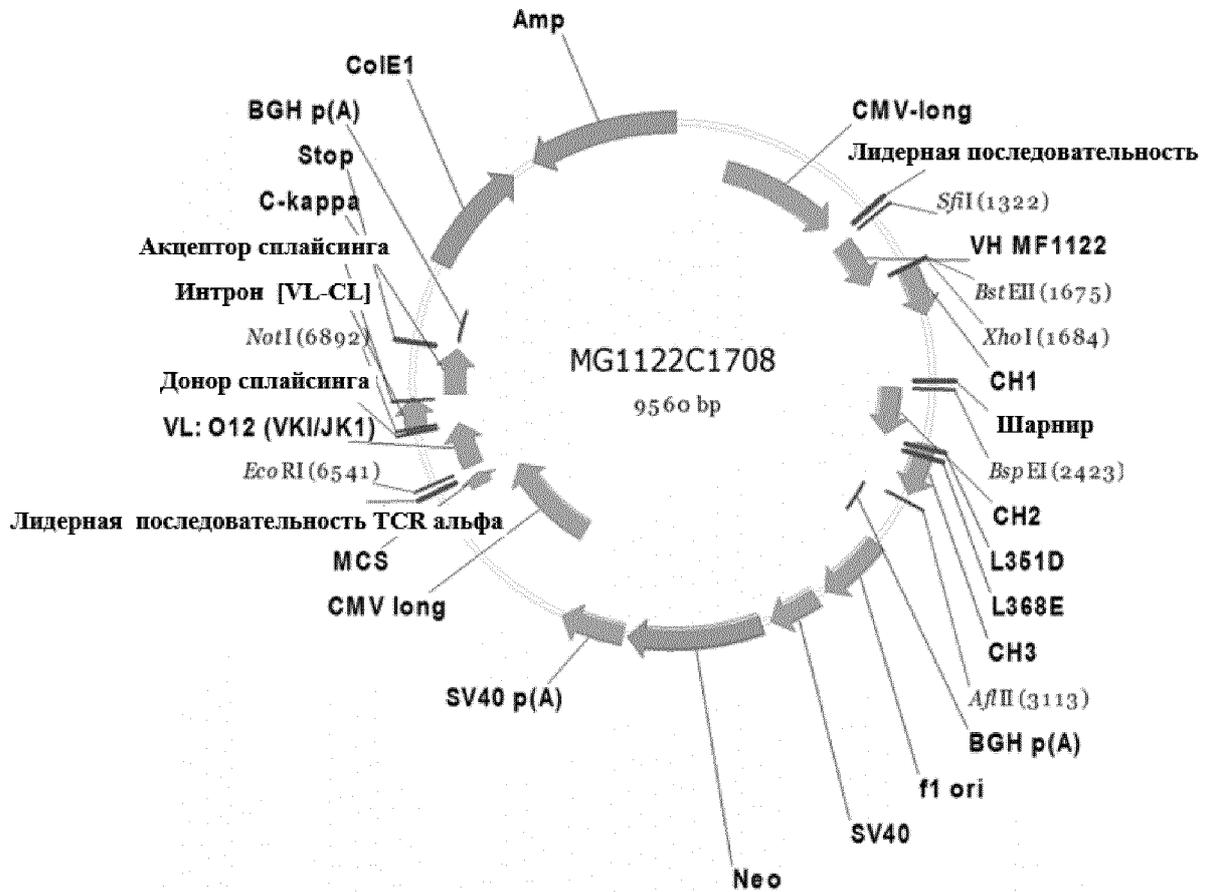
а) аминокислота в положении 364 является валином, изолейцином, треонином, глутамином или лейцином; и/или

б) аминокислота в положении 409 является изолейцином, лейцином или

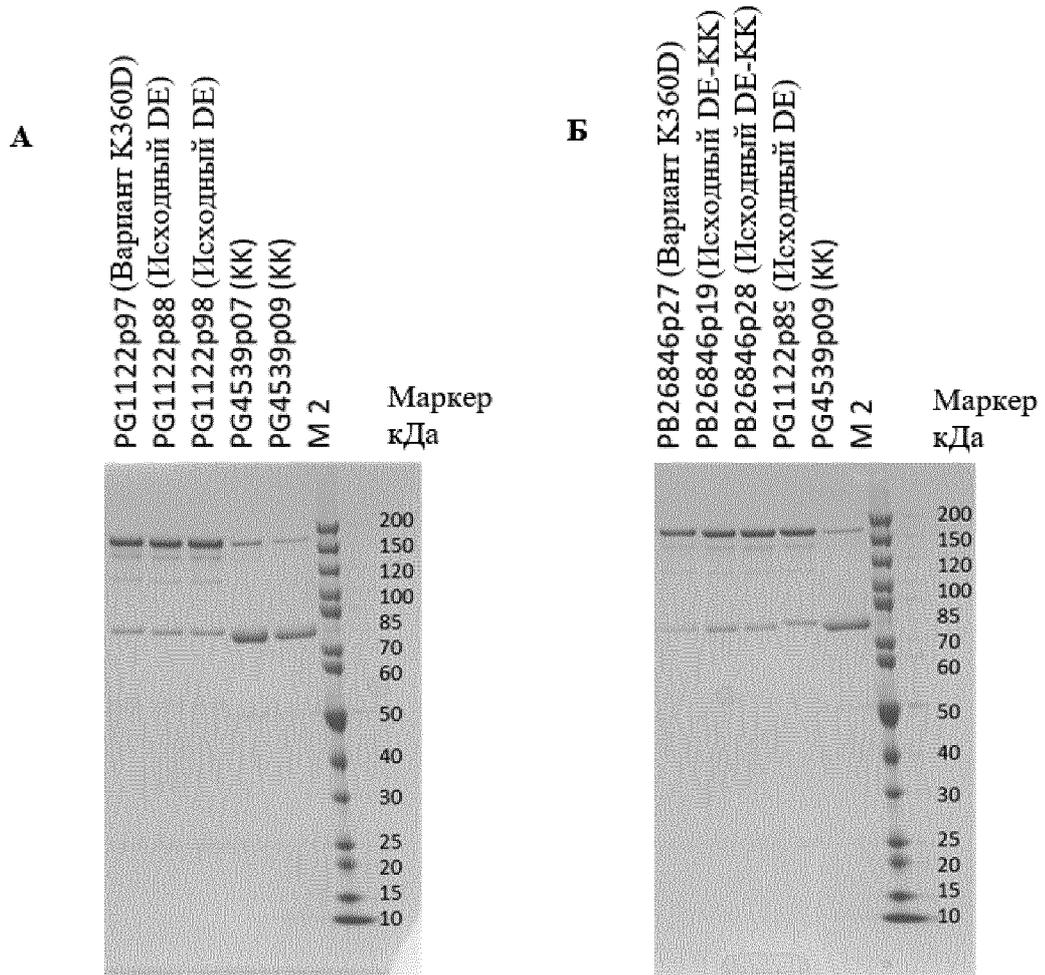
20 глутаматом; и/или

в) аминокислота в положении 360 является аспартатом.

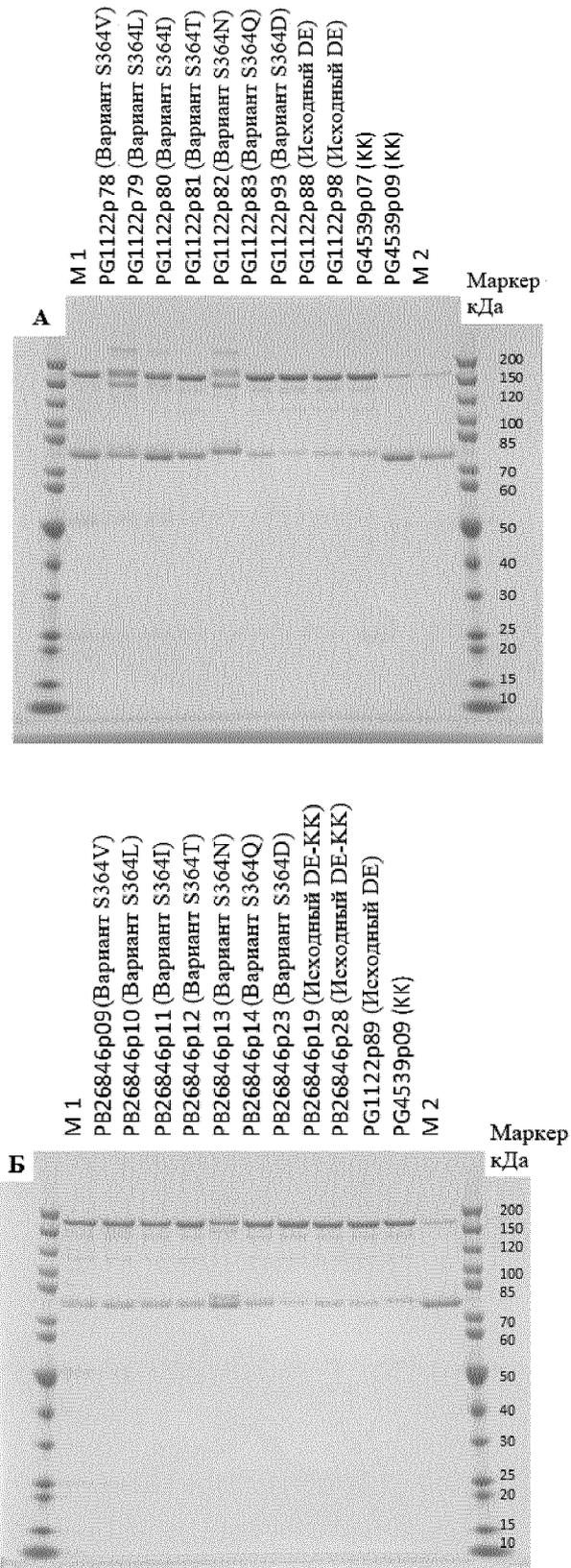
15. Гетеродимерный белок, полученный способом по п. 9.



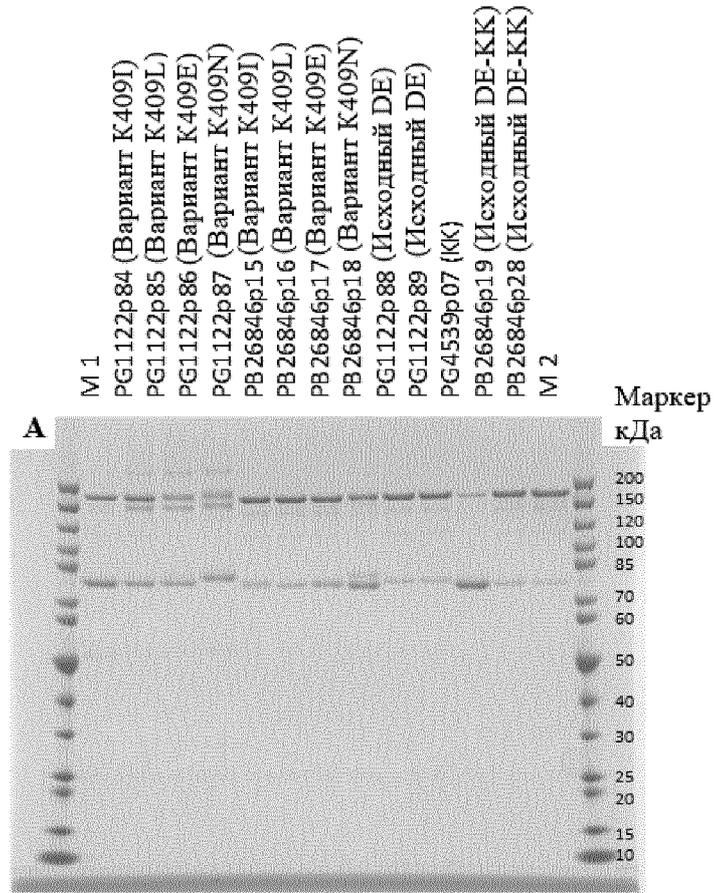
Фигура 1.



Фигура 2.



Фигура 3.



Фигура 4.