

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В
СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро

(43) Дата международной публикации
16 марта 2023 (16.03.2023)



(10) Номер международной публикации
WO 2023/038548 A1

(51) Международная патентная классификация:

C07K 16/28 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

(21) Номер международной заявки: PCT/RU2022/050281

(22) Дата международной подачи:

07 сентября 2022 (07.09.2022)

(25) Язык подачи: Русский

(26) Язык публикации: Русский

(30) Данные о приоритете:

2021126369 08 сентября 2021 (08.09.2021) RU

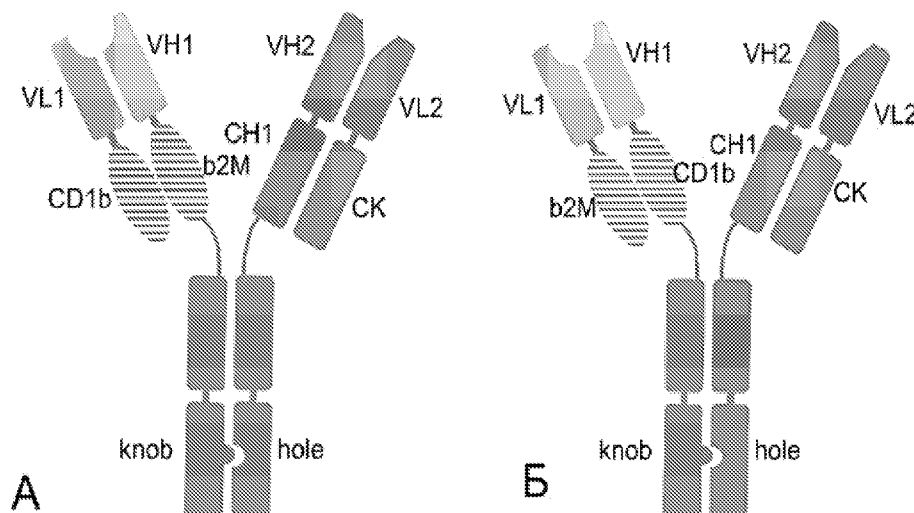
(71) Заявитель: АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО "БИО-
КАД" (JOINT STOCK COMPANY «BIOCAD»)
[RU/RU]; вн. тер. г. поселок Стрельна, п. Стрельна, ул.

Связи, 38, стр. 1, помещ. 89, Санкт-Петербург, 198515,
Saint Petersburg (RU).

(72) Изобретатели: ЛЕГОЦКИЙ, Сергей Александрович (LEGOTSKIY, Sergei Aleksandrovich); ул. Татьяны Макаровой, д. 6, кв.140, Москва, 111675, Moscow (RU). НАЗАРЕНКО, Ольга Викторовна (NAZARENKO, Olga Viktorovna); ул. Железнодорожная, д. 26, кв. 59, Гп Кузьмоловский, Всеволожский р-н, Ленинградская обл., 188663, Gp Kuzmolovskiy, Vsevolozhskiy r-n, Leningradskaya obl. (RU). ДАНИЛОВ, Максим Андреевич (DANILOV, Maksim Andreevich); б-р Разведчика, д.2, корп. 2, кв.77, Петергоф, Санкт-Петербург, 198516, Petergof, Saint Petersburg (RU). БАРАНОВСКАЯ, Марианна Дмитриевна (BARANOVSKAIA, Marianna Dmitrievna); ул. Парковая, д.14, корп. 5, стр.1, кв.103, Петергоф, Санкт-Петербург, 198510, Petergof, Saint Petersburg (RU). ПО-

(54) Title: BISPECIFIC ANTIBODY COMPRISING A HETERODIMER BASED ON MHC PROTEINS

(54) Название изобретения: БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО, СОДЕРЖАЩЕЕ ГЕТЕРОДИМЕР НА ОСНОВЕ МНС БЕЛКОВ



Фиг. 1

(57) Abstract: The present invention relates to the field of biotechnology, and more particularly to bivalent bispecific chimeric antibodies comprising a heterodimer based on juxtamembrane domains of MHC (major histocompatibility complex) or MHC-like proteins (CD1 (cluster of differentiation 1) or HFE (haemochromatosis protein)), and also to a process for obtaining said bispecific antibodies. The invention further relates to a nucleic acid that codes for said bispecific antibody, an expression vector, a host cell for obtaining said bivalent bispecific chimeric antibody and a method of obtaining said cell.

(57) Реферат: Настоящее изобретение относится к области биотехнологии, а именно к двухвалентным биспецифическим химерным антителам, которые включают гетеродимер на основе околосмембранных доменов МНС (главный комплекс гистосовместимости, ГКГС) или МНС-подобных белков (CD1 (кластер дифференцировки 1) или HFE (белок гемохроматоза)), а также к

[продолжение на следующей странице]



WO 2023/038548 A1



ЛЯКОВ, Дмитрий Николаевич (POLIAKOV, Dmitrii Nikolaevich); ул. Парковая, д. 14, корп. 5, стр. 1, кв. 104, Петергоф, Санкт-Петербург, 198510, Petergof, Saint Petersburg (RU). **ВАЛИАХМЕТОВА, Эльвира Раисовна (VALIAKHMETOVA, Elvira Raisovna)**; ул. Лесная, д. 12, кв. 94, Кумертау, Респ. Башкортостан, 453300, Kumertau, Resp. Bashkortostan (RU). **ТОПОРКОВА, КСЕНИЯ АЛЕКСАНДРОВНА (TOPORKOVA, Kseniia Aleksandrovna)**; Петергофское шоссе, д. 45, кв. 975, Санкт-Петербург, 198335, Saint Petersburg (RU). **МАТЮХИНА, Наталья Михайловна (MATIUKHINA, Natalia Mikhailovna)**; Ленинский пр-кт, д. 53, корп. 4, кв. 115, Санкт-Петербург, 198328, Saint Petersburg (RU). **КРАТ, Сергей Михайлович (KRAT, Sergei Mikhailovich)**; ул. Летчика Лихолетова, д. 14, корп. 4, кв. 162, Санкт-Петербург, 198206, Saint Petersburg (RU). **ГУРИНА, Наталья Николаевна (GURINA, Natalia Nikolaevna)**; ул. Будапештская, д. 17, корп. 2, кв. 175, Санкт-Петербург, 192212, Saint Petersburg (RU). **ЯКОВЛЕВ, Павел Андреевич (IAKOVLEV, Pavel Andreevich)**; ул. Большая Подъячская, д. 29, кв. 16, Санкт-Петербург, 190068, Saint Petersburg (RU). **МОРОЗОВ, Дмитрий Валентинович (MOROZOV, Dmitry Valentinovich)**; Адмиралтейский р-н, ул. Почтамтская, д. 20, кв. 3, Санкт-Петербург, 190000, Saint Petersburg (RU).

(74) **Агент: МЕЛЬЧАЕВА, Ольга Анатольевна (MELCHAEVA, Olga Anatolevna)**; вн. тер. г. поселок Стрельна, п. Стрельна, ул. Связи, 38, стр. 1, помещ. 89, Санкт-Петербург, 198515, Saint Petersburg (RU).

(81) **Указанные государства** (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) **Указанные государства** (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), европейский патент (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Опубликована:

- с отчётом о международном поиске (статья 21.3)
- до истечения срока для изменения формулы изобретения и с повторной публикацией в случае получения изменений (правило 48.2(h))
- с перечнем последовательностей в соответствии с Правилom 5.2(a)
- в черно-белом варианте; международная заявка в поданном виде содержит цвет или оттенки серого и доступна для загрузки из PATENTSCOPE.

технологии получения данных биспецифических антител. Изобретение также относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей данное биспецифическое антитело, вектору экспрессии, клетке-хозяину для получения данного двухвалентного химерного биспецифического антитела и способу получения данной клетки.

БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО, СОДЕРЖАЩЕЕ ГЕТЕРОДИМЕР
НА ОСНОВЕ МНС БЕЛКОВ

Область техники

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии, а именно к двухвалентным биспецифическим химерным антителам, которые включают гетеродимер на основе околосмембранных доменов МНС (главный комплекс гистосовместимости, ГКГС) или МНС-подобных белков (CD1 (кластер дифференцировки 1) или HFE (белок гемохроматоза)), а также к технологии получения данных биспецифических антител. Изобретение также относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей данное биспецифическое антитело, вектору экспрессии, клетке-хозяину для получения данного двухвалентного химерного биспецифического антитела и способу получения данной клетки.

Предшествующий уровень техники

Моноклональные антитела в виде химерных, гуманизированных или полностью человеческих молекул доказали свою ценность в качестве эффективных лекарств для лечения ряда нарушений и заболеваний.

Природные молекулы антител человека состоят из двух гомодимеров тяжелых цепей, каждый из которых образует гетеродимер в партнерстве с двумя идентичными молекулами легкой цепи. Обычные моноклональные антитела в виде целых молекул состоят из двухвалентных («двухруких») гетеродимеров тяжелых и легких цепей.

Часто заболевания возникают в результате нескольких патологий и сопровождаются множеством сопутствующих заболеваний. Биспецифические антитела обладают способностью связывать и тем самым нейтрализовать два или более отличных друг от друга антигена на молекулу антитела. Потенциал значительного улучшения терапевтических свойств (и ценности) лекарственных средств по сравнению с моноклональными антителами сделал биспецифические

антитела активной областью исследований. За последние двадцать лет в научной литературе было описано множество решений в отношении сконструированных версий биспецифических антител, как описано в Brinkmann, U and RE Kontermann, 2017, The Making of Bispecific Antibodies, MAbs; 209 Feb/Mar; 9(2):182–212, doi: 10.1080/19420862.2016.1268307.

Как было указано выше, существует много путей создания молекул со смешанными антигенсвязывающими доменами, то есть с антигенсвязывающими доменами, отличными друг от друга. Но каждый из указанных методов характеризуется своими недостатками.

Перекрестное сшивание химическими методами является трудоемким процессом, так как соответствующие части необходимо очистить от гомодимеров и других нежелательных побочных продуктов. Кроме того, стадии химической модификации могут изменить целостность белков, что ухудшает их устойчивость. Таким образом, указанный метод часто оказывается неэффективным и может привести к утрате активности антитела.

Метод, основанный на слиянии клеток (например, получение гибридом), представляет собой произвольную сборку двух тяжелых и двух легких цепей, в результате чего образуется 10 комбинаций антител. Целевые гетеромультимерные антитела составляют небольшую часть полученных таким образом антител. Выделение целевых гетеромультимерных белков существенно уменьшает выход продукта и увеличивает производственные затраты.

Методы рекомбинантных ДНК используют для создания разных гетеромультимерных антител, например, одноцепочечных Fv фрагментов, диател и т.д., не содержащих Fc фрагмент. Основным недостатком молекулы антитела такого типа является отсутствие Fc домена и, следовательно, неспособность такого антитела запускать эффекторную функцию (такую как, например, активация комплемента, связывание с Fc-рецептором и т.д.). Таким образом, необходимо биспецифическое антитело, содержащее функциональный Fc домен.

Методы рекомбинантных ДНК также используют для создания биспецифических антител, соединяемых по типу «выступ во впадину» (Knob-into-

Holes). См. международные заявки WO9627011 и WO9850431, а также статью Merchant AM ET AL., An efficient route to human bispecific IgG, Nat Biotechnol. 1998 Jul;16(7):677-81. Одним фактором, ограничивающим применение данного метода, является то, что легкие цепи двух исходных антител должны быть идентичными для предотвращения ошибочного спаривания и образования нежелательных и/или неактивных молекул при экспрессии в одной клетке.

Чистота продукта биспецифических антител зависит от двух факторов:

- а) гетеродимерной сборки двух разных тяжелых цепей, коэкспрессируемых в клетке, и
- б) корректного спаривания двух разных легких цепей с соответствующими тяжелыми цепями.

Использование технологии «выступ во впадину» (Knob-into-Holes) для создания биспецифических антител позволяет решить проблему правильной гетеродимерной сборки двух разных тяжелых цепей, коэкспрессируемых в клетке. Однако использование только Knob-into-Holes для создания биспецифических антител позволяет достигнуть выхода правильно собранного биспецифика только около 25%, так как остается не решенной проблема правильного спаривания двух разных легких цепей с соответствующими тяжелыми цепями.

Проблема правильного спаривания двух разных легких цепей с соответствующими тяжелыми цепями решается различными способами:

1. Использование одинаковой легкой цепи в первой и второй антигенсвязывающих частях антитела (Van Blarcom T ET AL., Productive common light chain libraries yield diverse panels of high affinity bispecific antibodies, MAbs. 2018 Feb/Mar;10(2):256-268. doi: 10.1080/19420862.2017.1406570).

Недостатком данного решения является его не универсальность, так как не всегда удастся подобрать подходящую для обеих валентностей легкую цепь. В дополнении к этому, при замене аминокислот в легкой цепи для оптимизации свойств антигенсвязывающего фрагмента, замены затронут обе валентности. При этом связывание антитела ко второму антигену может быть нарушено.

2. Использование single-chain (одноцепочечных) форматов, то есть форматов, где легкая и тяжелая цепи антигенсвязывающего фрагмента, специфичного к первому антигену, соединены между собой через линкер из нескольких аминокислот.

У данного формата есть технологические недостатки, так как в нем используются линкеры либо для слияния основной структуры антитела (IgA, IgD, IgE, IgG или IgM) с дополнительным связывающим белком (например, scFv или scFab), либо для слияния, например, легкого и тяжелого переменных доменов (VH и VL) в составе scFv или легкой цепи (VL-CK(или CL)) с VH-CH1 в составе scFab. Линкеры могут представлять проблемы терапевтического плана. Фактически эти чужеродные пептиды могут вызывать иммунный ответ против самого линкера или области стыка между белком и линкером. Кроме того, гибкая природа этих пептидов и их подвижность делает их более чувствительными к протеолитическому расщеплению, что может приводить к плохой стабильности, агрегации и повышению иммуногенности антитела.

3. Модификация CH1-CK доменов в биспецифическом антителе, что позволит в технологиях экспрессии биспецифических антител изменять интерфейс взаимодействия таким образом, чтобы исключить неправильную ассоциацию легких цепей. Например, в международной заявке WO2017059551 указываются различные аминокислотные замены в CH1 и/или CK, которые способствуют предпочтительному спариванию нужной тяжелой цепи с нужной легкой цепью.

Несмотря на вышеуказанные различные технологии экспрессии биспецифических антител, в данной области техники, по-прежнему, существует потребность в улучшенной чистоте продукта биспецифических антител, а также в масштабируемом производственном решении для получения правильно собранных биспецифических антител.

Краткое описание изобретения

Разработанный авторами данного изобретения новый формат биспецифических химерных антител, которые включают гетеродимер на основе

околомембранных доменов МНС или МНС-подобных белков, например, CD1 (cluster of differentiation 1, кластер дифференцировки 1) или HFE (Human homeostatic iron regulator protein), а также технология получения данных биспецифических химерных антител, неожиданно позволяют получить с высоким выходом продукт с правильной гетеродимерной сборкой двух разных тяжелых цепей, коэкспрессируемых в клетке, и правильным спариванием двух разных легких цепей с соответствующими тяжелыми цепями.

Разработанный авторами данного изобретения новый формат биспецифических химерных антител, которые включают гетеродимер на основе околомембранных доменов МНС или МНС-подобных белков, а также технология получения данных биспецифических антител, неожиданно позволяют получить правильно собранный продукт биспецифических химерных антител с высокой чистотой.

Вышеуказанные результаты, как следствие, уменьшают производственные затраты и приводят к масштабируемому производственному решению для получения правильно собранных биспецифических антител.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к двухвалентному биспецифическому химерному антителу, где указанное антитело содержит:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с первым антигеном;

где первая легкая цепь содержит переменный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи;

где первая тяжелая цепь содержит переменный домен тяжелой цепи и константные домены тяжелой цепи антитела, включающие первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи;

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося со вторым антигеном,

где вторая легкая цепь содержит переменный домен легкой цепи и константный домен, который выбирают из группы:

первого околосмембранного домена МНС (главный комплекс гистосовместимости) или

первого околосмембранного домена МНС-подобного белка;

где вторая тяжелая цепь, содержит переменный домен тяжелой цепи, константный домен, который выбирают из группы:

второго околосмембранного домена МНС (главный комплекс гистосовместимости) или

второго околосмембранного домена МНС-подобного белка;

и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH₂) и третий (CH₃) константные домены тяжелой цепи;

при этом первый околосмембранный домен МНС или МНС-подобного белка и второй околосмембранный домен МНС или МНС-подобного белка образуют между собой гетеродимер, который стабилизирован дисульфидной связью;

где CH₃-домен одной тяжелой цепи и CH₃-домен другой тяжелой цепи соприкасаются друг с другом поверхностями, которые изменены для формирования двухвалентного биспецифического химерного антитела, причем данные изменения в CH₃ доменах тяжелых цепей представляют собой замены для обеспечения гетеродимеризации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околосмембранный домен МНС или МНС-подобного белка и второй околосмембранный домен МНС или МНС-подобного белка, которые образуют между собой гетеродимер, который стабилизирован дисульфидной связью за счет мутации или мутаций в первом и/или втором константном домене для образования S-S связи (дисульфидной связи, цистеинового мостика) между первым и вторым околосмембранными доменами МНС или МНС-подобного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околосмембранный домен МНС или МНС-подобного белка и второй околосмембранный домен МНС или МНС-подобного белка, которые образуют между собой гетеродимер, который

стабилизирован дисульфидной связью за счет удлинения первого околосмембранного домена МНС или МНС-подобного белка на одну или несколько (от 1 до 10) аминокислот на С-конце и с терминальным Cys на С-конце для образования S-S связи (дисульфидной связи, цистеинового мостика) между первым околосмембранным доменом МНС или МНС-подобного белка и шарниром (hinge).

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает удлинение первого околосмембранного домена МНС или МНС-подобного белка, которое представляет собой последовательность из трех аминокислот GSC.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает:

первую легкую цепь, которая содержит переменный домен легкой цепи (VL1) и константный домен легкой цепи;

первую тяжелую цепь, которая содержит переменный домен тяжелой цепи (VH1) и константные домены тяжелой цепи антитела, включающие первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи;

вторую легкую цепь, которая содержит переменный домен легкой цепи (VL2) и первый околосмембранный домен МНС или первый околосмембранный домен МНС-подобного белка;

вторую тяжелую цепь, которая содержит переменный домен тяжелой цепи (VH2), второй околосмембранный домен МНС или второй околосмембранный домен МНС-подобного белка и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи;

при этом первый околосмембранный домен МНС или МНС-подобного белка и второй околосмембранный домен МНС или МНС-подобного белка образуют между собой гетеродимер, который стабилизирован дисульфидной связью за счет мутации или мутаций в первом и/или втором константном домене для образования S-S связи (дисульфидной связи, цистеинового мостика) между первым и вторым околосмембранными доменами МНС или МНС-подобного белка;

где между первым вариантом Fc и вторым вариантом Fc в CH3 домене образована структура «выступ (Knob) во впадину (Hole)».

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает:

первую легкую цепь, которая содержит переменный домен легкой цепи (VL1) и константный домен легкой цепи;

первую тяжелую цепь, которая содержит переменный домен тяжелой цепи (VH1) и константные домены тяжелой цепи антитела, включающие первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи;

вторую легкую цепь, которая содержит переменный домен легкой цепи (VL2) и первый околомембранный домен MHC или первый околомембранный домен MHC-подобного белка;

вторую тяжелую цепь, которая содержит переменный домен тяжелой цепи (VH2), второй околомембранный домен MHC или второй околомембранный домен MHC-подобного белка и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи;

где между первым вариантом Fc и вторым вариантом Fc в CH3 домене образована структура «выступ (Knob) во впадину (Hole)»

где первый околомембранный домен MHC или первый околомембранный домен MHC-подобного белка дополнительно содержит удлинение первого околомембранного домена MHC или MHC-подобного белка на одну или несколько (от 1 до 10) аминокислот на C-конце с терминальным Cys на C-конце для образования S-S связи (дисульфидной связи, цистеинового мостика) между первым околомембранным доменом MHC или MHC-подобного белка и шарниром (hinge).

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает:

первую легкую цепь, которая содержит переменный домен легкой цепи (VL1) и константный домен легкой цепи;

первую тяжелую цепь, которая содержит переменный домен тяжелой цепи (VH1) и константные домены тяжелой цепи антитела, включающие первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи;

вторую легкую цепь, которая содержит переменный домен легкой цепи (VL2) и первый околомембранный домен MHC или первый околомембранный домен MHC-подобного белка;

вторую тяжелую цепь, которая содержит переменный домен тяжелой цепи (VH2), второй околомембранный домен MHC или второй околомембранный домен MHC-подобного белка и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи;

где между первым вариантом Fc и вторым вариантом Fc в CH3 домене образована структура «выступ (Knob) во впадину (Hole)»

где первый околомембранный домен MHC или первый околомембранный домен MHC-подобного белка дополнительно содержит удлинение первого околомембранного домена MHC или MHC-подобного белка на последовательность аминокислот GSC для образования S-S связи (дисульфидной связи, цистеинового мостика) между первым околомембранным доменом MHC или MHC-подобного белка и шарниром (hinge).

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околомембранный домен MHC, который может быть выбран из группы, включающей:

первый околомембранный домен MHC класса I (главный комплекс гистосовместимости класса I),

первый околомембранный домен MHC класса II (главный комплекс гистосовместимости класса II),

модифицированный вариант первого околомембранного домена MHC класса I или

модифицированный вариант первого околомембранного домена MHC класса II.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает второй околосмембранный домен МНС, который может быть выбран из группы, включающей:

второй околосмембранный домен МНС класса I (главный комплекс гистосовместимости класса I),

второй околосмембранный домен МНС класса II (главный комплекс гистосовместимости класса II),

модифицированный вариант второго околосмембранного домена МНС класса I или

модифицированный вариант второго околосмембранного домена МНС класса II.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает околосмембранный домен МНС класса I человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает околосмембранный домен МНС класса II человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает околосмембранный домен МНС класса II, который выбирают из группы: HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ или HLA-DR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает околосмембранный домен МНС класса I, который выбирают из группы: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F или HLA-G.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает околосмембранный домен МНС-подобного белка человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околосмембранный домен МНС-подобного белка, который может быть выбран из группы, включающей:

первый околосмембранный домен CD1 (кластер дифференцировки 1),
первый околосмембранный домен HFE (белок гемохроматоза),
модифицированный вариант первого околосмембранного домена CD1 или
модифицированный вариант первого околосмембранного домена HFE.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает второй околосмембранный домен МНС-подобного белка, который может быть выбран из группы, включающей:

второй околосмембранный домен CD1 (кластер дифференцировки 1),
второй околосмембранный домен HFE (белок гемохроматоза),
модифицированный вариант второго околосмембранного домена CD1 или
модифицированный вариант второго околосмембранного домена HFE.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает околосмембранный домен CD1, который выбирают из группы: CD1a, CD1b, CD1c, CD1d или CD1e.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает переменный фрагмент второй легкой цепи (VL), который отделен от первого околосмембранного домена МНС или МНС-подобного белка линкером длиной от 1 до 25 аминокислот, и/или переменный фрагмент второй тяжелой цепи (VH), который отделен от второго околосмембранного домена МНС или МНС-подобного белка линкером длиной от 1 до 25 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает:

а) СН3-домен одной тяжелой цепи, который изменен так, что на поверхности СН3-домена одной тяжелой цепи, которая соприкасается с поверхностью СН3-домена второй тяжелой цепи в двухвалентном биспецифическом антителе, аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, который имеет

большую по объему боковую цепь, что приводит к созданию выпуклости на поверхности СНЗ-домена одной тяжелой цепи, которая может помещаться в полость на поверхности СНЗ-домена другой тяжелой цепи,

и

б) СНЗ-домен другой тяжелой цепи, который изменен так, что на поверхности СНЗ-домена второй тяжелой цепи, которая соприкасается с поверхностью СНЗ-домена первой тяжелой в двухвалентном биспецифическом антителе, аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, который имеет меньшую по объему боковую цепь, что приводит к созданию полости на поверхности СНЗ-домена второй тяжелой цепи, в которую может помещаться выпуклость на поверхности раздела СНЗ-домена первой тяжелой цепи;

где указанный аминокислотный остаток, который имеет большую по объему боковую цепь, выбран из группы, включающей аргинин (R), фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W),

и где указанный аминокислотный остаток, который имеет меньшую по объему боковую цепь, выбран из группы, включающей аланин (A), серин (S), треонин (T), валин (V).

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает константный домен первой легкой цепи антитела, который выбирают из СК или CL.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает СНЗ-домены антитела, которые дополнительно изменены путем интродукции цистеина (C) в качестве аминокислоты в соответствующие положения каждого СНЗ-домена, так что между СНЗ-доменами может образоваться дисульфидный мостик.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает СНЗ-домен одной тяжелой цепи, который изменен с образованием Knob, и СНЗ-домен другой тяжелой цепи, который изменен с образованием Hole, или наоборот.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает CH3-домен одной тяжелой цепи, который имеет аминокислотные замены S354C/T366W, и CH3-домен другой тяжелой цепи, который имеет аминокислотные замены Y349C/T366S/L368A/Y407V.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает CH3-домен одной тяжелой цепи, который имеет аминокислотные замены Y349C/T366S/L368A/Y407, и CH3-домен другой тяжелой цепи, который имеет аминокислотные замены S354C/T366W.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околосмембранный домен МНС и второй околосмембранный домен МНС, которые, соответственно, представляют собой $\alpha 2$ домен МНС II и $\beta 2$ домен МНС II, и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околосмембранный домен МНС и второй околосмембранный домен МНС, которые, соответственно, представляют собой $\beta 2$ домен МНС II и $\alpha 2$ домен МНС II, и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает $\alpha 2$ домен МНС II, который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 38, и $\beta 2$ домен МНС II, который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 39.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околосмембранный домен МНС и второй околосмембранный домен МНС, которые, соответственно, представляют собой модифицированный вариант $\alpha 2$ домена МНС II и

модифицированный вариант $\beta 2$ домена МНС II, и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околомембранный домен МНС и второй околомембранный домен МНС, которые, соответственно, представляют собой модифицированный вариант $\beta 2$ домена МНС II и модифицированный вариант $\alpha 2$ домена МНС II, и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околомембранный домен МНС и второй околомембранный домен МНС, которые, соответственно, представляют собой $\alpha 3$ домен МНС I и $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$), и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околомембранный домен МНС и второй околомембранный домен МНС, которые, соответственно, представляют собой $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$) и $\alpha 3$ домен МНС I, и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает $\alpha 3$ домен МНС I, который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы SEQ ID NO: 1-29, и $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$), который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околомембранный домен МНС и второй околомембранный домен МНС, которые, соответственно, представляют собой модифицированный вариант $\alpha 3$ домена МНС I и модифицированный вариант $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$), и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околочембранный домен МНС и второй околочембранный домен МНС, которые, соответственно, представляют собой модифицированный вариант $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$) и модифицированный вариант $\alpha 3$ домена МНС I, и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает модифицированный вариант $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$), который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 48.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околочембранный домен МНС-подобного белка и второй околочембранный домен МНС-подобного белка, которые, соответственно, представляют собой $\alpha 3$ домен CD1 и $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$), и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околочембранный домен МНС-подобного белка и второй околочембранный домен МНС-подобного белка, которые, соответственно, представляют собой $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$) и $\alpha 3$ домен CD1, и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает $\alpha 3$ домен CD1, который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы SEQ ID NO: 40-44, и $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$), который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околочембранный домен МНС-подобного белка и второй околочембранный домен МНС-подобного белка, которые, соответственно, представляют собой модифицированный вариант $\alpha 3$

домена CD1 и модифицированный вариант $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$), и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околосмембранный домен МНС-подобного белка и второй околосмембранный домен МНС-подобного белка, которые, соответственно, представляют собой модифицированный вариант $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$) и модифицированный вариант $\alpha 3$ домена CD1, и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает модифицированный вариант $\alpha 3$ домена CD1, который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы SEQ ID NO: 49-56 и или SEQ ID NO: 109, и модифицированный вариант $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$), который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 48.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околосмембранный домен МНС-подобного белка и второй околосмембранный домен МНС-подобного белка, которые, соответственно, представляют собой $\alpha 3$ домен HFE и $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$), и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околосмембранный домен МНС-подобного белка и второй околосмембранный домен МНС-подобного белка, которые, соответственно, представляют собой $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$) и $\alpha 3$ домен HFE, и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает $\alpha 3$ домен HFE, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$), который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околосмембранный домен МНС-подобного белка и второй околосмембранный домен МНС-подобного белка, которые, соответственно, представляют собой модифицированный вариант $\alpha 3$ домена HFE и модифицированный вариант $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$), и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околосмембранный домен МНС-подобного белка и второй околосмембранный домен МНС-подобного белка, которые, соответственно, представляют собой модифицированный вариант $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$) и модифицированный вариант $\alpha 3$ домена HFE, и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает модифицированный вариант $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$), который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 48.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает модифицированный вариант МНС или МНС-подобного белка, где под модифицированным вариантом подразумевается вариант, включающий замены на цистеин (C) для образования дисульфидного мостика между цепями гетеродимера, полученного из первого и второго околосмембранных доменов МНС или МНС-подобного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает модифицированный вариант МНС или МНС-подобного белка, где под модифицированным вариантом подразумевается вариант, включающий одну или более замен в различных позициях околосмембранных доменов МНС или МНС-подобного белка, приводящие к увеличению термодинамической стабильности T_m более чем на 1 градус Цельсия в сравнении с дикой формой околосмембранных доменов МНС или МНС-подобного белка, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает модифицированный вариант МНС или МНС-подобного белка, где под модифицированным вариантом подразумевается вариант, включающий одну или более замен в различных позициях околосмембранных доменов МНС или МНС-подобного белка, приводящие к уменьшению количества агрегатов на более чем 5% при концентрации выше 10 мг/ мл в сравнении с дикой формой околосмембранных доменов МНС или МНС-подобного белка, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает модифицированный вариант МНС или МНС-подобного белка, где под модифицированным вариантом подразумевается вариант, включающий одну или более замен в различных позициях околосмембранных доменов МНС или МНС-подобного белка, приводящие к удалению сайтов гликозилирования в сравнении с дикой формой околосмембранных доменов МНС или МНС-подобного белка, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает вариативный домен первой легкой цепи и вариативный домен второй легкой цепи, которые идентичны.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает Fc-фрагмент, который относится к IgG.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает Fc-фрагмент, который выбирают из группы: IgG1, IgG2, или IgG4 человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает мономер Fc-фрагмента, где дополнительно вводят замены, приводящие к отсутствию ADCC, CDC и/или ADCP свойств у двухвалентного биспецифического антитела.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает мономер Fc-фрагмента, где дополнительно вводят замены LALA (L234A и L235A).

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает мономер Fc-фрагмента, где дополнительно вводят замены, приводящие к пролонгированному действию антитела.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает мономер Fc-фрагмента, где дополнительно вводят замены YTE (M252Y, S254T и T256E).

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает мономер Fc-фрагмента, где дополнительно вводят замены, приводящие к усилению ADCC, CDC и/или ADCP свойств у двухвалентного биспецифического антитела.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает мономер Fc-фрагмента, где дополнительно вводят замену E345R.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело специфически связывается с CD20 и CD3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело специфически связывается с BCMA и CD3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело специфически связывается с PD-L1 и CD47.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело специфически связывается с фактором свертывания крови 9 (FIX) и фактором свертывания крови 10 (FX).

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело специфически связывается с GD2 и CD3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело специфически связывается с AXL и CD3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело специфически связывается с PD-L1 и TGF beta.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, которая кодирует любое из вышеуказанных двухвалентных биспецифических химерных антител.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой ДНК.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору, содержащему любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения клетки-хозяина для получения любого из вышеуказанных двухвалентных биспецифических химерных антител и включает трансформирование клетки вышеуказанным экспрессионным вектором.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к клетке-хозяину для получения любого из вышеуказанных двухвалентных биспецифических химерных антител, которая содержит любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения любого из вышеуказанных двухвалентных биспецифических химерных антител, который включает следующие этапы:

а) трансформация клетки-хозяина

- экспрессионными векторами, которые содержат молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие первую легкую цепь и первую тяжелую цепь биспецифического химерного антитела,

- экспрессионными векторами, которые содержат молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь биспецифического химерного антитела,

б) культивирование клетки-хозяина в условиях, которые позволяют синтезировать указанное двухвалентное биспецифическое химерное антитело; и

в) выделение указанного двухвалентного биспецифического антитела из культуры клеток.

Краткое описание чертежей

Фигура 1 представляет собой схематическое изображение формата двухвалентного биспецифического химерного антитела.

А – «прямая» ориентация димеризующего блока, Б – «обратная» ориентация димеризующего блока

VH1, VL1 – переменные домены тяжелой и легкой цепи, соответственно, отвечающие за связывание с антигеном 1;

VH2, VL2 – переменные домены, отвечающие за связывание с антигеном 2.

CH1, CK – константные домены тяжелой и легкой цепи, соответственно;

b2M – β 2-микроглобулин,

CD1b - α 3 домен белка CD1b.

Knob, hole – мутации в CH3-домене антитела, обеспечивающие гетеродимеризацию тяжелых цепей.

Фигура 2 представляет собой схематичное изображение комплекса тяжелой и лёгкой цепей химерного антитела с заменой доменов CH1 и CK на β 2-микроглобулин и околочелюстной домен α 3 белка CD1b.

А — «прямая» ориентация доменов димеризующего блока;

Б — «обратная» ориентация димеризующих блоков.

VH, VL — переменные домены антитела,

b2M — β 2-микроглобулин,

CD1b — околочелюстной α 3 домен белка CD1b,

hinge — шарнирная область антитела, первые 5 аминокислот показаны в явном виде,

Fc — Fc-фрагмент антитела;

аминокислоты с C-конца доменов b2M, α 3 CD1b и с N-конца шарнирного региона показаны в явном виде;

SS-связь показана пунктиром.

Фигура 3 представляет собой электрофореграмму химерных антител, содержащих и не содержащих дополнительные дисульфидные связи между тяжелой и легкой цепями, 7,5% ПААГ, нередуцирующие условия.

Дорожки:

M – стандартный маркер Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD), молекулярные массы соответствующих полос указаны в кДа в столбце слева от геля;

1- Контроль Prolgolimab – IgG1;

2 – Моноспецифическое химерное антитело на основе переменных доменов Prolgolimab и доменов МНС-подобных белков, заменяющих СН1-СК, с дополнительным дисульфидным мостиком;

3 – Моноспецифическое химерное антитело на основе переменных доменов Prolgolimab и доменов МНС-подобных белков, заменяющих СН1-СК, без дополнительного дисульфидного мостика;

4 – Моноспецифическое химерное антитело на основе переменных доменов Prolgolimab и доменов МНС-подобных белков, заменяющих СН1-СК, в «обратной» ориентации с дополнительным дисульфидным мостиком.

Фигура 4 представляет собой схему эксперимента по проверке влияния МНС-димеризующего блока на некорректное спаривание тяжелых и легких цепей. Овалами обозначены домены, заменяющие СН1 и СК, взятые из МНС-подобных белков.

Группа 1: образцы 01-001 – 01-003 - антитела с «корректным» сочетанием VH и VL и «некорректной» парой константных доменов.

Группа 2: образцы 01-004 – 01-007 - антитела с «некорректным» сочетанием VH и VL и «корректной» парой константных доменов.

Группа 3: образцы 01-008 – 01-010 – антитела с «некорректным» сочетанием VH и VL и «некорректной» парой константных доменов.

Группа 4: образцы 01-011 и 01-012- контрольные антитела, представляющие собой химерное антитело, в котором константные домены заменены на МНС- димеризующие блоки, и классическое антитело формата IgG1, соответственно.

Под «корректным» сочетанием VH и VL подразумевается пара VH и VL, взятая из одного антитела. Под «некорректным» сочетанием VH и VL подразумеваются VH и VL, взятые из разных антител.

Под «корректной» парой константных доменов подразумевается либо пара CH1-СК либо пара доменов из МНС-подобных белков (в данном случае $\beta 2$ -микроглобулин и $\alpha 3$ -домен белка CD1b). Под «некорректной» парой константных доменов подразумеваются пары CH1-CD1b или $\beta 2$ -микроглобулин-СК.

Фигура 5 представляет собой электрофореграмму образцов, полученных в эксперименте по неправильному спариванию цепей. 7,5% ПААГ, нередуцирующие условия.

А - Дорожки:

М – стандартный маркер Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD), молекулярные массы соответствующих полос указаны в кДа в столбце слева от геля;

1 – 01-001;

2 – 01-002;

3 – 01-007;

4 – 01-008;

5 – 01-009;

6 – 01-012;

Б - Дорожки:

М – стандартный маркер Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD);

1 – 01-003;

2 – 01-004;

3 – 01-005;

4 – 01-006;

5 – 01-007,

6 – 01-012;

В - Дорожки:

М – стандартный маркер Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD);

1 – 01-010;

2 – 01-011.

Фигура 6 представляет собой электрофореграмму биспецифических химерных антител.

А – 7,5% ПААГ, нередуцирующие условия,

Б – 12.5% ПААГ, редуцирующие условия.

Дорожки:

М – стандартный маркер Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD), молекулярные массы соответствующих полос указаны в кДа в столбце слева от геля;

1 – 02-004,

2 – 02-005,

3 – 02-006,

4 – 02-007,

5 – 02-008,

6 – 02-009.

Фигура 7 представляет собой сенсограмму эксперимента по одновременному взаимодействию антител 02-006 и 02-007 с двумя различными антигенами (hPD1ex-H6F и hCSF1R_His). Этапы (шаги эксперимента) пронумерованы в верхней части изображения и разделены вертикальными линиями. Для каждого антитела приведены 2 сенсограммы – взаимодействие с hCSF1R_His на 8 шаге (наблюдается увеличение уровня сигнала) и референсный сигнал в буфере 1хКБ без hCSF1R_His на 8 шаге (нет увеличения уровня сигнала).

Фигура 8 представляет собой деконволюированный масс-спектр хроматограммы полного ионного тока для образца 02-004.

А – пик 4,

Б - пик 5,

В – пик 6.

Фигура 9 представляет собой электрофореграмму SDS-гель электрофореза биспецифических химерных антител после протеолиза протеазой GingisKHAN. 7,5% ПААГ, нередуцирующие условия.

А - дорожки:

М - стандартный маркер Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD), молекулярные массы соответствующих полос указаны в кДа в столбце слева от геля;

1 – 02-004 без обработки GingisKHAN,

2 - 02-009 без обработки GingisKHAN,

3 – Ocrelizumab без обработки GingisKHAN,

4 – 01-011 без обработки GingisKHAN,

5 – Prolgolimab без обработки GingisKHAN,

6 - 02-004 без обработки GingisKHAN в буфере 100 мМ бикарбонат аммония pH 7.2;

Б – дорожки:

М- стандартный маркер Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD);

1 - 02-004 после протеолиза GingisKHAN,

2 - 02-009 после протеолиза GingisKHAN,

3 – Ocrelizumab после протеолиза GingisKHAN,

4 – 01-011 после протеолиза GingisKHAN,

5 – Prolgolimab после протеолиза GingisKHAN,

6 - 02-004 после протеолиза GingisKHAN в буфере 100 мМ бикарбонат аммония pH 7.2,

В - дорожки:

М - стандартный маркер Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD),

- 1 - 02-005 без обработки GingisKHAN,
- 2 - 02-005 после протеолиза GingisKHAN,
- 3 - 02-006 без обработки GingisKHAN,
- 4 - 02-006 после протеолиза GingisKHAN,
- 5 - 02-007 без обработки GingisKHAN,
- 6 - 02-007 после протеолиза GingisKHAN,

Г – дорожки:

М- стандартный маркер Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD),

- 1 - 02-008 без обработки GingisKHAN,
- 2 - 02-008 после протеолиза GingisKHAN,
- 3 - 02-004 без обработки GingisKHAN,
- 4 - 02-004 после протеолиза GingisKHAN.

Фигура 10 представляет собой электрофореграмму образцов с модификациями, внесенными в димеризующий блок на основе околосмембранных доменов МНС-подобного белка. 7,5% ПААГ, нередуцирующие условия.

А – Дорожки:

М – стандартный маркер Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD), молекулярные массы соответствующих полос указаны в кДа в столбце слева от геля;

- 1 – Prolgolimab;
- 2 – 01-011;
- 3 – 03-003;
- 4 – 03-004;
- 5 – 03-005;
- 6 – 03-006;
- 7 – 03-007;
- 8 – 03-008.

Б - Дорожки:

М – стандартный маркер Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD);

1 – Prolgolimab;

2 – 01-011;

3 – 03-001;

4 – 03-002.

Описание изобретения

Общие определения и общие методы

Если иное не определено в настоящем документе, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, будут иметь значения, которые обычно понятны специалистам в данной области.

Кроме того, если по контексту не требуется иное, термины в единственном числе включают в себя термины во множественном числе, и термины во множественном числе включают в себя термины в единственном числе. Как правило, используемая классификация и методы культивирования клеток, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики, аналитической химии, химии органического синтеза, медицинской и фармацевтической химии, а также гибридизации и химии белка и нуклеиновых кислот, описанные в настоящем документе, хорошо известны специалистам и широко применяются в данной области. Ферментативные реакции и способы очистки осуществляют в соответствии с инструкциями производителя, как это обычно осуществляется в данной области, или как описано в настоящем документе.

Термин «KD» в данном описании относится к константе аффинности (или константе равновесия), которую получают из отношения K_d к K_a (т.е. K_d/K_a), и ее выражают в виде молярной концентрации (M).

«Аффинность связывания» обычно относится к силе совокупных нековалентных взаимодействий между единичным сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). Если

не указано иначе, «аффинность связывания» относится к внутренней (характерной, истинной) аффинности связывания, которая отражает 1:1 взаимодействие между членами пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к своему партнеру Y обычно можно представить константой аффинности (KD). Желательно, чтобы величина KD составляла, примерно, 200 нМ, 150 нМ, 100 нМ, 60 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 20 нМ, 10 нМ, 8 нМ, 6 нМ, 4 нМ, 2 нМ, 1 нМ или менее. Аффинность можно измерять обычными методами, известными в уровне техники, включая методы по данному описанию. Низкоаффинные антитела обычно медленно связываются с антигеном и имеют тенденцию легко диссоциировать, тогда как высокоаффинные антитела обычно быстрее связывают антиген и имеют тенденцию дольше оставаться в связанном состоянии. В уровне техники известны различные методы измерения аффинности связывания, любой из этих методов можно использовать для целей настоящего изобретения.

Термин «Kd», «koff» или «kdis» относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия связывающей молекулы и антигена. Константу скорости диссоциации koff можно измерить посредством биослойной интерферометрии, например, с помощью системы Octet™.

Термин «Ka», «kon» или «on-rate» относится к константе скорости ассоциации.

Термин «R²» относится к коэффициенту детерминации.

Термин «Response» относится к сигналу связывания антитела с антигеном.

В настоящем описании и в последующей формуле изобретения, если контекстом не предусмотрено иное, слова «включать» и «содержать» или их вариации, такие как «включает», «включающий», «содержит» или «содержащий», следует понимать как включение указанного целого или группы целых, но не исключение любого другого целого или группы целых.

Подробное описание изобретения

Двухвалентное биспецифическое химерное антитело

Настоящее изобретение относится к двухвалентному биспецифическому химерному антителу.

Антитело по изобретению является моноклональным антителом.

Термин «моноклональное антитело» или «mAb» относится к антителу, которое синтезировано и выделено отдельной клональной популяцией клеток.

Антитело по изобретению является рекомбинантным антителом.

Термин «рекомбинантное антитело» означает антитело, которое экспрессируется в клетке или клеточной линии, содержащей нуклеотидную последовательность (нуклеотидные последовательности), которая кодирует антитело, при этом указанная нуклеотидная последовательность (нуклеотидные последовательности) не ассоциирована с клеткой в природе.

Двухвалентные биспецифические химерные антитела по изобретению являются выделенным антителом.

Определение «выделенный» («изолированный»), применяемое для описания различных антител по данному описанию, означает антитело, идентифицированное и выделенное и/или регенерированное из клетки или клеточной культуры, в которой оно экспрессируется. Примеси (загрязняющие компоненты) из природной среды представляют собой материалы, которые, как правило, мешают диагностическому или терапевтическому применению полипептида, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. Обычно выделенный полипептид получают в результате по меньшей мере одной стадии очистки.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к двухвалентному биспецифическому химерному антителу, где указанное антитело содержит:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с первым антигеном;

где первая легкая цепь содержит переменный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи;

где первая тяжелая цепь содержит переменный домен тяжелой цепи и константные домены тяжелой цепи антитела, включающие первый (CH1)

константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи;

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося со вторым антигеном,

где вторая легкая цепь содержит переменный домен легкой цепи и константный домен, который выбирают из группы:

первого околомембранного домена МНС (главный комплекс гистосовместимости) или

первого околомембранного домена МНС-подобного белка;

где вторая тяжелая цепь, содержит переменный домен тяжелой цепи, константный домен, который выбирают из группы:

второго околомембранного домена МНС (главный комплекс гистосовместимости) или

второго околомембранного домена МНС-подобного белка;

и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи;

при этом первый околомембранный домен МНС или МНС-подобного белка и второй околомембранный домен МНС или МНС-подобного белка образуют между собой гетеродимер, который стабилизирован дисульфидной связью;

где CH3-домен одной тяжелой цепи и CH3-домен другой тяжелой цепи соприкасаются друг с другом поверхностями, которые изменены для формирования двухвалентного биспецифического химерного антитела, причем данные изменения в CH3 доменах тяжелых цепей представляют собой замены для обеспечения гетеродимеризации.

Под гетеродимером, который образован первым околомембранным доменом МНС или МНС-подобного белка и вторым околомембранным доменом МНС или МНС-подобного белка, и стабилизирован дисульфидной связью понимается:

1) гетеродимер, который включает мутацию или мутации в первом и/или втором околомембранном домене МНС или МНС-подобного белка для

образования S-S связи (дисульфидной связи, цистеинового мостика) между первым и вторым околосмембранным доменом МНС или МНС-подобного белка;

или

2) удлинение первого околосмембранного домена МНС или МНС-подобного белка на одну или несколько (от 1 до 10) аминокислот на С-конце и с терминальным Cys на С-конце для образования S-S связи (дисульфидной связи, цистеинового мостика) между первым околосмембранным доменом МНС или МНС-подобного белка и шарниром (hinge).

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околосмембранный домен МНС или МНС-подобного белка и второй околосмембранный домен МНС или МНС-подобного белка, которые образуют между собой гетеродимер, который стабилизирован дисульфидной связью за счет мутации или мутаций в первом и/или втором околосмембранном домене МНС или МНС-подобного белка для образования S-S связи (дисульфидной связи, цистеинового мостика) между первым и вторым околосмембранным доменом МНС или МНС-подобного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околосмембранный домен МНС или МНС-подобного белка и второй околосмембранный домен МНС или МНС-подобного белка, которые образуют между собой гетеродимер, который стабилизирован дисульфидной связью за счет удлинения первого околосмембранного домена МНС или МНС-подобного белка на одну или несколько (от 1 до 10) аминокислот на С-конце и с терминальным Cys на С-конце для образования S-S связи (дисульфидной связи, цистеинового мостика) между первым околосмембранным доменом МНС или МНС-подобного белка и шарниром (hinge).

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает удлинение первого околосмембранного домена МНС или МНС-подобного белка, которое представляет собой последовательность из трех аминокислот GSC.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает:

первую легкую цепь, которая содержит переменный домен легкой цепи (VL1) и константный домен легкой цепи;

первую тяжелую цепь, которая содержит переменный домен тяжелой цепи (VH1) и константные домены тяжелой цепи антитела, включающие первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи;

вторую легкую цепь, которая содержит переменный домен легкой цепи (VL2) и первый околомембранный домен МНС или первый околомембранный домен МНС-подобного белка;

вторую тяжелую цепь, которая содержит переменный домен тяжелой цепи (VH2), второй околомембранный домен МНС или второй околомембранный домен МНС-подобного белка и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи;

при этом первый околомембранный домен МНС или МНС-подобного белка и второй околомембранный домен МНС или МНС-подобного белка образуют между собой гетеродимер, который стабилизирован дисульфидной связью за счет мутации или мутаций в первом и/или втором околомембранном домене МНС или МНС-подобного белка для образования S-S связи (дисульфидной связи, цистеинового мостика) между первым и вторым околомембранным доменом МНС или МНС-подобного белка;

где между первым вариантом Fc и вторым вариантом Fc в CH3 домене образована структура «выступ (Knob) во впадину (Hole)».

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает:

первую легкую цепь, которая содержит переменный домен легкой цепи (VL1) и константный домен легкой цепи;

первую тяжелую цепь, которая содержит переменный домен тяжелой цепи (VH1) и константные домены тяжелой цепи антитела, включающие первый (CH1)

константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи;

вторую легкую цепь, которая содержит переменный домен легкой цепи (VL2) и первый околомембранный домен МНС или первый околомембранный домен МНС-подобного белка;

вторую тяжелую цепь, которая содержит переменный домен тяжелой цепи (VH2), второй околомембранный домен МНС или второй околомембранный домен МНС-подобного белка и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи;

где между первым вариантом Fc и вторым вариантом Fc в CH3 домене образована структура «выступ (Knob) во впадину (Hole)»,

где первый околомембранный домен МНС или первый околомембранный домен МНС-подобного белка дополнительно содержит удлинение первого околомембранного домена МНС или МНС-подобного белка на одну или несколько (от 1 до 10) аминокислот на С-конце и с терминальным Cys на С-конце для образования S-S связи (дисульфидной связи, цистеинового мостика) между первым околомембранным доменом МНС или МНС-подобного белка и шарниром (hinge).

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает:

первую легкую цепь, которая содержит переменный домен легкой цепи (VL1) и константный домен легкой цепи;

первую тяжелую цепь, которая содержит переменный домен тяжелой цепи (VH1) и константные домены тяжелой цепи антитела, включающие первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи;

вторую легкую цепь, которая содержит переменный домен легкой цепи (VL2) и первый околомембранный домен МНС или первый околомембранный домен МНС-подобного белка;

вторую тяжелую цепь, которая содержит переменный домен тяжелой цепи (VH2), второй околомембранный домен МНС или второй околомембранный домен

МНС-подобного белка и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи;

где между первым вариантом Fc и вторым вариантом Fc в CH3 домене образована структура «выступ (Knob) во впадину (Hole)»

где первый околосмембранный домен МНС или первый околосмембранный домен МНС-подобного белка дополнительно содержит удлинение первого околосмембранного домена МНС или МНС-подобного белка на GSC для образования S-S связи (дисульфидной связи, цистеинового мостика) между первым околосмембранным доменом МНС или МНС-подобного белка и шарниром (hinge).

В вышеуказанном двухвалентном биспецифическом химерном антителе переменные и константные домены расположены в тяжелых и легких цепях в следующей последовательности:

первая легкая цепь:

- 1) переменный домен легкой цепи,
- 2) константный домен легкой цепи;

первая тяжелая цепь антитела:

- 1) переменный домен тяжелой цепи,
- 2) первый (CH1) константный домен тяжелой цепи,
- 3) второй (CH2) константный домен тяжелой цепи и
- 4) третий (CH3) константный домен тяжелой цепи;

вторая легкая цепь:

- 1) переменный домен легкой цепи,
- 2) первый околосмембранный домен МНС или первый околосмембранный домен МНС-подобного белка;

вторая тяжелая цепь антитела:

- 1) переменный домен тяжелой цепи,
- 2) второй околосмембранный домен МНС или второй околосмембранный домен МНС-подобного белка,
- 3) второй (CH2) константный домен тяжелой цепи и
- 4) третий (CH3) константный домен тяжелой цепи.

Некоторые варианты формата вышеуказанного двухвалентного биспецифического химерного антитела представлены на фигуре 1.

Термин «антитело» или «иммуноглобулин» (Ig), как использовано в данном описании, включает целые антитела. Термин «антитело» относится к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, взаимосвязанные дисульфидными связями, или его антигенсвязывающей части. Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (сокращенно называемую в данном описании как VH) и константную область тяжелой цепи. Известно пять типов тяжелых цепей антител млекопитающих, которые обозначают греческими буквами: α , δ , ϵ , γ и μ . (Janeway C.A., Jr. и др., Immunobiology, 5-е изд., изд-во Garland Publishing, 2001). Присутствующий тип тяжелой цепи определяет класс антитела; указанные цепи обнаружены в антителах типа IgA, IgD, IgE, IgG и IgM соответственно (Rhoades R.A., Pflanzner R.G., Human Physiology, 4-е изд., изд-во Thomson Learning, 2002). Различные тяжелые цепи отличаются по размеру и составу; α и γ содержат примерно 450 аминокислот, а μ и ϵ состоят примерно из 550 аминокислот. Константная область является идентичной во всех антителах одного и того же изотипа, но отличается в антителах различного изотипа. Тяжелые цепи γ , α и δ содержат константную область, которая состоит из трех константных доменов CH1, CH2 и CH3 (выстроены в ряд) и шарнирной области, которая придает гибкость (Woof J., Burton D., Nat Rev Immunol 4, 2004, сс.89-99); тяжелые цепи μ и ϵ содержат константную область, которая состоит из четырех константных доменов CH1, CH2, CH3 и CH4 (Janeway C.A., Jr. и др., Immunobiology, 5-е изд., изд-во Garland Publishing, 2001). У млекопитающих известно только два типа легких цепей, которые обозначают как лямбда (λ) и каппа (κ). Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно называемой в данном описании как VL) и константной области легкой цепи. Примерная длина легкой цепи составляет 211-217 аминокислот. Предпочтительно легкая цепь представляет собой легкую каппа (κ)-цепь, а константный домен CL предпочтительно представляет собой C-каппа (κ).

«Антитела» согласно изобретению могут представлять собой антитела любого класса (например, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, предпочтительно IgG) или подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2, предпочтительно IgG1).

Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), расположенные между областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат домен связывания, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями хозяина или факторами, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторными клетками), и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Термин «антигенсвязывающая часть» антитела или «антигенсвязывающий фрагмент» (или просто «часть антитела» или «фрагмент антитела»), как использовано в данном описании, относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Пример связывающего фрагмента, включенного в термин «антигенсвязывающая часть» антитела включает Fab-фрагмент, то есть одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1 или Fab-подобный фрагмент, то есть одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, первого околомембранного домена MHC или MHC-подобного белка и второго околомембранного домена MHC или MHC-подобного белка.

Предпочтительно CDR антигенсвязывающего участка или весь антигенсвязывающий участок антител по изобретению имеет происхождение из мыши, ламы или донорской человеческой библиотеки или по существу человеческое происхождение с определенными аминокислотными остатками, измененными, например, замещенными разными аминокислотными остатками с тем, чтобы оптимизировать конкретные свойства антитела, например KD, koff,

IC50, EC50, ED50. Предпочтительно каркасные участки антитела по изобретению имеют человеческое происхождение или по существу человеческое происхождение (по крайней мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% человеческое происхождение).

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий участок антитела по изобретению может происходить из других нечеловеческих видов, включая мышь, ламу, кролика, крысу или хомяка, но не ограничиваясь ими. Альтернативно, антигенсвязывающий участок может происходить из человеческих видов.

Термин «вариабельный» относится к тому факту, что определенные сегменты вариабельных доменов широко отличаются в последовательности среди антител. Домен V опосредует связывание антигена и определяет специфичность конкретного антитела к его конкретному антигену. Однако вариабельность неравномерно распределяется на участке вариабельных доменов из 110 аминокислот. Напротив, V области состоят из инвариантных фрагментов, называемых каркасными областями (FR) из 15-30 аминокислот, разделенных более короткими участками чрезвычайной вариабельности, называемых «гипервариабельными областями» или CDR. Каждый вариабельный домен нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре FR, в основном принимающих конфигурацию бета-листов, связанных тремя гипервариабельными областями, которые образуют петли, связывающие, и в некоторых случаях являющиеся частью бета-складчатой структуры. Гипервариабельные области в каждой цепи удерживаются вместе в тесной близости с помощью FR и с гипервариабельными областями другой цепи вносят вклад в образование антигенсвязывающего сайта антител (см. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5 th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Константные домены не принимают непосредственного участия в связывании антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ, ADCC).

Термин «гипервариабельная область» по данному описанию относится к аминокислотным остаткам антитела, которые отвечают за связывание антигена.

Обычно гипервариабельная область содержит аминокислотные остатки из «области, определяющей комплементарность» или «CDR», и/или такие остатки из «гипервариабельной петли».

«Kabat номенклатура» или «номенклатура по Kabat» применяются в данной заявке к системе нумерации аминокислотных остатков, которые являются более вариабельными (т.е. гипервариабельными), чем остальные аминокислотные остатки в вариабельных участках тяжелой и легкой цепи антитела (Kabat et al. Ann. N.Y. Acad. Sci., 190:382-93 (1971); Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)).

Антитело по данному изобретению, «которое связывает» целевой антиген, представляет собой антитело, которое связывает антиген с достаточной аффинностью так, что антитело можно применять в качестве диагностического и/или терапевтического агента при нацеливании на белок или клетку или ткань, экспрессирующую антиген, и в незначительной степени перекрестно реагирует с другими белками. По данным аналитических методов: сортинга флуоресцентно-активированных клеток (FACS), радиоиммунопреципитации (RIA) или ИФА (ELISA), в таких вариантах изобретения степень связывания антитела с белком, не являющимся «мишенью» (с «нецелевым белком»), составляет менее 10% от связывания антитела с конкретным белком-мишенью. По отношению к связыванию антитела с молекулой-мишенью термин «специфическое связывание» или выражения «специфически связывается с» или «специфический к» конкретному полипептиду или эпитопу на конкретном полипептиде-мишени означает связывание, которое заметно (измеримо) отличается от неспецифического взаимодействия.

Специфическое связывание можно определять количественно, например, определяя связывание молекулы по сравнению со связыванием контрольной молекулы. Например, специфическое связывание можно определять конкурентной реакцией с другой молекулой, аналогичной мишени, например, с избытком немеченой мишени. В этом случае специфическое связывание указывается, если

связывание меченой мишени с зондом конкурентно ингибируется избытком немеченой мишени. В данном описании термин «специфическое связывание» или выражения «специфически связывается с» или «специфический к» конкретному полипептиду или эпитопу на конкретном полипептиде-мишени можно характеризовать на примере молекулы, имеющей KD к мишени по меньшей мере около 200 нМ, или же по меньшей мере около 150 нМ, или же по меньшей мере около 100 нМ, или же по меньшей мере около 60 нМ, или же по меньшей мере около 50 нМ, или же по меньшей мере около 40 нМ, или же по меньшей мере около 30 нМ, или же по меньшей мере около 20 нМ, или же по меньшей мере около 10 нМ, или же по меньшей мере около 8 нМ, или же по меньшей мере около 6 нМ, или же по меньшей мере около 4 нМ, или же по меньшей мере около 2 нМ, или же по меньшей мере около 1 нМ или выше. В одном варианте изобретения термин «специфическое связывание» относится к связыванию, при котором молекула связывается с конкретным полипептидом или эпитопом на конкретном полипептиде, практически не связываясь с каким-либо другим полипептидом или эпитопом на полипептиде.

Термин «биспецифическое антитело» означает антитело, содержащее антигенсвязывающие домены, которые способны к специфическому связыванию с двумя различными эпитопами на одной биологической молекуле или способны к специфическому связыванию с эпитопами на двух различных биологических молекулах. Биспецифичное антитело также упоминается в настоящем документе, как обладающее «двойной специфичностью» или как являющееся антителом с «двойной специфичностью».

Кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина (англ. fragment crystallizable region, Fc region, Fc) — это концевая часть молекулы иммуноглобулина, которая взаимодействует с Fc-рецептором на поверхности клетки и с некоторыми белками системы комплемента. Данное свойство позволяет антителам активировать иммунную систему. Fc-участок IgG, IgA и IgD изотипов состоит из двух одинаковых белковых фрагментов, соответственно, второго и третьего константных доменов двух тяжелых цепей; в случае изотипов IgM и IgE

Fc содержит три константных домена тяжелых цепей (домены CH2, CH3 и CH4) в каждой полипептидной цепочке.

Под «мономером Fc-фрагмента» подразумевается Fc-участок из второго и третьего константных доменов любой одной из двух тяжелых цепей (для IgG, IgA и IgD изотипов); в случае изотипов IgM и IgE мономер Fc содержит три константных домена одной из двух тяжелых цепей (домены CH2, CH3 и CH4).

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает:

первую легкую цепь, которая содержит переменный домен легкой цепи (VL1) и константный домен легкой цепи;

первую тяжелую цепь, которая содержит переменный домен тяжелой цепи (VH1) и константные домены тяжелой цепи антитела, включающие первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи;

вторую легкую цепь, которая содержит переменный домен легкой цепи (VL2) и первый околомембранный домен МНС или первый околомембранный домен МНС-подобного белка;

вторую тяжелую цепь, которая содержит переменный домен тяжелой цепи (VH2), второй околомембранный домен МНС или второй околомембранный домен МНС-подобного белка и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи;

и где между первым вариантом Fc и вторым вариантом Fc в CH3 домене образована структура «выступ (Knob) во впадину (Hole)»

и между вторым околомембранным доменом МНС и/или вторым околомембранным доменом МНС-подобного белка и шарниром (hinge) вставили дополнительный пептидный линкер.

Термин «пептидный линкер» в настоящем документе означает любой пептид с возможностью соединения доменов с длиной в зависимости от доменов, которые он связывает между собой, содержащий любую аминокислотную последовательность. Предпочтительно пептидный линкер

имеет длину 4 аминокислоты и более и состоит из любого набора аминокислот, выбранного из G, A, S, P, E, T, D, K.

Под МНС (major histocompatibility complex, главный комплекс гистосовместимости, ГКГС) подразумевается молекула главного комплекса гистосовместимости, которая представляет собой центральный компонент иммунной системы позвоночных, находящийся на поверхности всех ядродержащих клеток. МНС находится в двух основных формах, а именно МНС класса I и II.

Под МНС-подобными белками подразумеваются белки, которые имеют структурное сходство с экстраклеточной частью молекул МНС класса I или молекул МНС класса II. В частности, под МНС-подобными белками подразумеваются, например, белок CD1 (cluster of differentiation 1, кластер дифференцировки 1) или белок HFE (Hereditary hemochromatosis protein, белок гемохроматоза).

Общее структурное сходство между молекулами МНС I, II, CD1 и HFE очевидно. Это - однотипность пространственной организации всей молекулы, количество доменов (четыре), структурное сходство околосмембранных доменов МНС и МНС-подобных белков, а также антигенсвязывающего участка, близкие мол. веса.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околосмембранный домен МНС, который может быть выбран из группы, включающей:

первый околосмембранный домен МНС класса I (главный комплекс гистосовместимости класса I),

первый околосмембранный домен МНС класса II (главный комплекс гистосовместимости класса II),

модифицированный вариант первого околосмембранного домена МНС класса I или

модифицированный вариант первого околосмембранного домена МНС класса II.

У людей классические гены МНС I называются HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F или HLA-G. Молекулы класса I состоят из двух полипептидных цепей: полиморфной α цепи (в некоторых случаях имеющей название тяжелая цепь) и меньшей цепи, которая называется $\beta 2$ микроглобулин (также известная как легкая цепь), которая в основном не является полиморфной. Эти две цепи образуют нековалентный гетеродимер на клеточной поверхности. α цепь содержит три домена ($\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$). Экзон 1 гена α цепи кодирует лидерную последовательность, экзоны 2 и 3 кодируют $\alpha 1$ и $\alpha 2$ домены, экзон 4 кодирует $\alpha 3$ домен, экзон 5 кодирует трансмембранный домен, и экзоны 6 и 7 кодируют цитоплазматический хвост. α цепь образует антигенсвязывающую область, включающую в себя $\alpha 1$ и $\alpha 2$ домены.

За $\alpha 2$ доменом следует $\alpha 3$ домен, который расположен с С-конца экстраклеточной части α цепи МНС I и образует с $\beta 2$ микроглобулином гетеродимерный нековалентный комплекс. Данный гетеродимерный нековалентный комплекс, состоящий из $\alpha 3$ домена МНС I и $\beta 2$ микроглобулина, в описании данного изобретения называется гетеродимер на основе околосмембранных доменов МНС I.

Молекулы МНС класса I экспрессируются на всех ядродержащих клетках, включающих в себя опухолевые клетки. Они экспрессируются специфически на Т- и В-лимфоцитах, макрофагах, дендритных клетках и нейтрофилах, среди прочих клеток, и функционируют для представления пептидных фрагментов (как правило 8-10 аминокислот в длину) на поверхности CD8⁺ цитотоксическим Т-лимфоцитам (CTL).

У людей классические гены МНС II называются HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ или HLA-DR. Молекулы МНС класса II являются гетеродимерами, построенными из нековалентно сцепленных альфа- и бета-цепей. Внеклеточная часть каждой из цепей состоит из двух доменов ($\alpha 1$ (альфа1), $\alpha 2$ (альфа2) и $\beta 1$ (бета1), $\beta 2$ (бета2), соответственно) и соединена коротким пептидом с трансмембранным сегментом (длиной примерно 30 аминокислотных остатков). Трансмембранный сегмент переходит в цитоплазматический домен, содержащий примерно 10-15 остатков.

Антигенсвязывающая область молекул МНС класса II формируется альфа-спиральными участками взаимодействующих цепей подобно молекулам класса I, но при одном существенном отличии: антигенсвязывающая полость молекул МНС класса II формируется не двумя доменами одной альфа-цепи, а двумя доменами разных цепей - доменами $\alpha 1$ и $\beta 1$.

За $\alpha 1$ доменом следует $\alpha 2$ домен, который образует с $\beta 2$ доменом гетеродимерный нековалентный комплекс. Данный гетеродимерный нековалентный комплекс, состоящий из $\alpha 2$ домена МНС II и $\beta 2$ домена МНС II, в описании данного изобретения называется гетеродимер на основе околосмембранных доменов МНС II.

В структуре молекул МНС класса II антигенсвязывающая полость открыта больше, чем у молекул МНС класса I, поэтому в ней могут поместиться более длинные пептиды.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает второй околосмембранный домен МНС, который может быть выбран из группы, включающей:

второй околосмембранный домен МНС класса I (главный комплекс гистосовместимости класса I),

второй околосмембранный домен МНС класса II (главный комплекс гистосовместимости класса II),

модифицированный вариант второго околосмембранного домена МНС класса I или

модифицированный вариант второго околосмембранного домена МНС класса II.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает околосмембранный домен МНС класса I человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает околосмембранный домен МНС класса II человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околосмембранный домен МНС, который может быть выбран из группы, включающей:

первый околосмембранный домен МНС класса I (главный комплекс гистосовместимости класса I),

первый околосмембранный домен МНС класса II (главный комплекс гистосовместимости класса II),

модифицированный вариант первого околосмембранного домена МНС класса I или

модифицированный вариант первого околосмембранного домена МНС класса II,

и

второй околосмембранный домен МНС, который может быть выбран из группы, включающей:

второй околосмембранный домен МНС класса I (главный комплекс гистосовместимости класса I),

второй околосмембранный домен МНС класса II (главный комплекс гистосовместимости класса II),

модифицированный вариант второго околосмембранного домена МНС класса I или

модифицированный вариант второго околосмембранного домена МНС класса II.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает:

первый околосмембранный домен МНС, который представляет собой первый околосмембранный домен МНС класса I (главный комплекс гистосовместимости класса I),

и

второй околосмембранный домен МНС, который представляет собой второй околосмембранный домен МНС класса I (главный комплекс гистосовместимости класса I).

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает:

первый околосмембранный домен МНС, который представляет собой первый околосмембранный домен МНС класса II (главный комплекс гистосовместимости класса II),

и

второй околосмембранный домен МНС, который представляет собой второй околосмембранный домен МНС класса II (главный комплекс гистосовместимости класса II).

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает:

первый околосмембранный домен МНС, который представляет собой модифицированный вариант первого околосмембранного домена МНС класса I,

и

второй околосмембранный домен МНС, который представляет собой модифицированный вариант второго околосмембранного домена МНС класса I.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает:

первый околосмембранный домен МНС, который представляет собой модифицированный вариант первого околосмембранного домена МНС класса II,

и

второй околосмембранный домен МНС, который представляет собой модифицированный вариант второго околосмембранного домена МНС класса II.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает:

первый околосмембранный домен МНС, который представляет собой первый околосмембранный домен МНС класса I (главный комплекс гистосовместимости класса I),

и

второй околосмембранный домен МНС, который представляет собой модифицированный вариант второго околосмембранного домена МНС класса I.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает:

первый околосмембранный домен МНС, который представляет собой модифицированный вариант первого околосмембранного домена МНС класса I,

и

второй околосмембранный домен МНС, который представляет собой второй околосмембранный домен МНС класса I (главный комплекс гистосовместимости класса I).

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает:

первый околосмембранный домен МНС, который представляет собой первый околосмембранный домен МНС класса II (главный комплекс гистосовместимости класса II),

и

второй околосмембранный домен МНС, который представляет собой модифицированный вариант второго околосмембранного домена МНС класса II.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает:

первый околосмембранный домен МНС, который представляет собой модифицированный вариант первого околосмембранного домена МНС класса II,

и

второй околосмембранный домен МНС, который представляет собой второй околосмембранный домен МНС класса II (главный комплекс гистосовместимости класса II).

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает околосмембранный домен MHC класса II, который выбирают из группы: HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ или HLA-DR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает околосмембранный домен MHC класса I, который выбирают из группы: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F или HLA-G.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает околосмембранный домен MHC-подобного белка человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околосмембранный домен MHC-подобного белка, который может быть выбран из группы, включающей:

первый околосмембранный домен CD1 (кластер дифференцировки 1),
первый околосмембранный домен HFE (белок гемохроматоза),
модифицированный вариант первого околосмембранного домена CD1 или
модифицированный вариант первого околосмембранного домена HFE.

Под CD1 (cluster of differentiation 1, кластер дифференцировки 1) подразумевается молекула кластера дифференцировки 1, которая является компонентом иммунной системы, находящейся на поверхности различных антиген-презентирующих клеток, таких как дендритные, клетки, макрофаги и прочие клетки. Так же, как и MHC классов I, II, CD1 презентируют антигены для распознавания Т-клетками через взаимодействие с Т-клеточным рецептором. В отличие от MHC классов I, II, белки CD1 презентируют липиды и их производные, а не пептиды.

Множество вариантов CD1, встречающихся у людей подразделяют на 5 групп: CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, которые отличаются структурой антигенсвязывающего фрагмента и, как следствие, специфичностью по отношению к липидам разной структуры. Белки группы CD1e, в отличие от белков остальных

групп, не экспрессируются на поверхности клеток, а являются растворимыми и отвечают за транспорт липидов (Kaczmarek, R., Pasciak, M., Szymczak-Kulus, K., & Czerwinski, M. (2017). CD1: A Singed Cat of the Three Antigen Presentation Systems. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 65(3), 201–214).

Молекулы CD1 схожи по структуре с МНС класса I. По аналогии, одна молекула CD1 является нековалентным комплексом двух полипептидных цепей: полиморфной α цепи (в некоторых случаях имеющей название тяжелая цепь) и меньшей цепи, которая называется $\beta 2$ микроглобулин (также известная как легкая цепь), которая в основном не является полиморфной.

α цепь образует антигенсвязывающую область, включающую в себя $\alpha 1$ и $\alpha 2$ домены. За $\alpha 2$ доменом следует $\alpha 3$ домен, который расположен с С-конца экстраклеточной части α цепи CD1 и образует с $\beta 2$ микроглобулином гетеродимерный нековалентный комплекс. Данный гетеродимерный нековалентный комплекс, состоящий из $\alpha 3$ домена CD1 и $\beta 2$ микроглобулина, в описании данного изобретения называется гетеродимер на основе околосмембранных доменов МНС-подобных белков.

Под HFE (Hereditary hemochromatosis protein, белок гемохроматоза) подразумевается молекула белка гемохроматоза. Лocus гена HFE человека расположен в 6й хромосоме и состоит из 5 экзонов и 4 интронов. Белок гемохроматоза – это мембранный белок, ассоциированный с $\beta 2$ микроглобулином, отвечает за регуляцию абсорбции железа через регуляцию взаимодействия трансферрина с рецептором трансферрина. Мутации в гене HFE приводят к гемохроматозу – рецессивной патологии обмена железа, связанной с его накоплением в различных органах. Молекула HFE по структуре аналогична с МНС I. Одна молекула HFE является нековалентным комплексом двух полипептидных цепей: полиморфной α цепи (в некоторых случаях имеющей название тяжелая цепь) и меньшей цепи, которая называется $\beta 2$ микроглобулин (также известная как легкая цепь), которая в основном не является полиморфной.

α цепь включает в себя $\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$ домены. $\alpha 3$ домен следует за $\alpha 2$ домен и располагается с С-конца экстраклеточной части α цепи HFE и образует с $\beta 2$

микроглобулином гетеродимерный нековалентный комплекс. Данный гетеродимерный нековалентный комплекс, состоящий из $\alpha 3$ домена HFE и $\beta 2$ микроглобулина, в описании данного изобретения называется гетеродимер на основе околосмембранных доменов МНС-подобных белков.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает второй околосмембранный домен МНС-подобного белка, который может быть выбран из группы, включающей:

второй околосмембранный домен CD1 (кластер дифференцировки 1),
второй околосмембранный домен HFE (белок гемохроматоза),
модифицированный вариант второго околосмембранного домена CD1 или
модифицированный вариант второго околосмембранного домена HFE.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает:

первый околосмембранный домен МНС-подобного белка, который может быть выбран из группы, включающей:

первый околосмембранный домен CD1 (кластер дифференцировки 1),
первый околосмембранный домен HFE (белок гемохроматоза),
модифицированный вариант первого околосмембранного домена CD1 или
модифицированный вариант первого околосмембранного домена HFE,
и

второй околосмембранный домен МНС-подобного белка, который может быть выбран из группы, включающей:

второй околосмембранный домен CD1 (кластер дифференцировки 1),
второй околосмембранный домен HFE (белок гемохроматоза),
модифицированный вариант второго околосмембранного домена CD1 или
модифицированный вариант второго околосмембранного домена HFE.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает:

первый околосмембранный домен МНС-подобного белка, который представляет собой первый околосмембранный домен CD1,

и

второй околосмембранный домен МНС-подобного белка, который представляет собой второй околосмембранный домен CD1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает:

первый околосмембранный домен МНС-подобного белка, который представляет собой первый околосмембранный домен HFE,

и

второй околосмембранный домен МНС-подобного белка, который представляет собой второй околосмембранный домен HFE,

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает:

первый околосмембранный домен МНС-подобного белка, который представляет собой модифицированный вариант первого околосмембранного домена CD1,

и

второй околосмембранный домен МНС-подобного белка, который представляет собой модифицированный вариант второго околосмембранного домена CD1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает:

первый околосмембранный домен МНС-подобного белка, который представляет собой модифицированный вариант первого околосмембранного домена HFE,

и

второй околосмембранный домен МНС-подобного белка, который представляет собой модифицированный вариант второго околосмембранного домена HFE.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает:

первый околосмембранный домен МНС-подобного белка, который представляет собой первый околосмембранный домен CD1,

и

второй околосмембранный домен МНС-подобного белка, который представляет собой модифицированный вариант второго околосмембранного домена CD1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает:

первый околосмембранный домен МНС-подобного белка, который представляет собой модифицированный вариант первого околосмембранного домена CD1,

и

второй околосмембранный домен МНС-подобного белка, который представляет собой второй околосмембранный домен CD1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает:

первый околосмембранный домен МНС-подобного белка, который представляет собой первый околосмембранный домен HFE,

и

второй околосмембранный домен МНС-подобного белка, который представляет собой модифицированный вариант второго околосмембранного домена HFE.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает:

первый околосмембранный домен МНС-подобного белка, который представляет собой модифицированный вариант первого околосмембранного домена HFE,

и

второй околосмембранный домен МНС-подобного белка, который представляет собой второй околосмембранный домен HFE.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает околосмембранный домен CD1, который выбирают из группы: CD1a, CD1b, CD1c, CD1d или CD1e.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает переменный фрагмент второй легкой цепи (VL), который отделен от первого околосмембранного домена МНС или МНС-подобного белка линкером длиной от 1 до 25 аминокислот, и/или переменный фрагмент второй тяжелой цепи (VH), который отделен от второго околосмембранного домена МНС или МНС-подобного белка линкером длиной от 1 до 25 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает:

а) СНЗ-домен одной тяжелой цепи, который изменен так, что на поверхности СНЗ-домена одной тяжелой цепи, которая соприкасается с поверхностью СНЗ-домена второй тяжелой цепи в двухвалентном биспецифическом антителе, аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, который имеет большую по объему боковую цепь, что приводит к созданию выпуклости на поверхности СНЗ-домена одной тяжелой цепи, которая может помещаться в полость на поверхности СНЗ-домена другой тяжелой цепи,

и

б) СНЗ-домен другой тяжелой цепи, который изменен так, что на поверхности СНЗ-домена второй тяжелой цепи, которая соприкасается с поверхностью СНЗ-домена первой тяжелой в двухвалентном биспецифическом антителе, аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, который имеет меньшую по объему боковую цепь, что приводит к созданию полости на поверхности СНЗ-домена второй тяжелой цепи, в которую может помещаться выпуклость на поверхности раздела СНЗ-домена первой тяжелой цепи;

где указанный аминокислотный остаток, который имеет большую по объему боковую цепь, выбран из группы, включающей аргинин (R), фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W),

и где указанный аминокислотный остаток, который имеет меньшую по объему боковую цепь, выбран из группы, включающей аланин (А), серин (S), треонин (Т), валин (V).

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает константный домен первой легкой цепи антитела, который выбирают из СК или CL.

У млекопитающих известно только два типа легких цепей, которые обозначают как лямбда (λ) и каппа (κ). Константной домен лямбда легкой цепи обозначается как CL, а каппа легкой цепи обозначается как СК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает СНЗ-домены антитела, которые дополнительно изменены путем интродукции цистеина (С) в качестве аминокислоты в соответствующие положения каждого СНЗ-домена, так что дисульфидный мостик может образовываться между обоими СНЗ-доменами.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает СНЗ-домен одной тяжелой цепи, который изменен с образованием Knob, и СНЗ-домен другой тяжелой цепи, который изменен с образованием Hole, или наоборот.

«knobs -into-holes» (взаимодействие по типу «выступ-впадина») это подход, с помощью которого можно обойти проблему, связанную с имеющимися ошибочные спаривания побочными продуктами. Данный подход направлен на усиление спаривания двух различных тяжелых цепей антитела путем интродукции мутаций в СНЗ-домены для модификации поверхности раздела в области контакта. На одной цепи имеющие большие размеры аминокислоты заменяли на аминокислоты с короткими боковыми цепями для создания «впадины». И, наоборот, аминокислоты с более крупными боковыми цепями интродуцировали в другой СНЗ-домен, создавая «выступ». Путем совместной экспрессии этих двух тяжелых цепей получали высокий выход гетеродимерной формации («выступ-впадина») относительно гомодимерной формации («впадина-впадина» или «выступ-выступ»)

(WO9627011 и WO9850431, а также статью Merchant AM ET ALL., An efficient route to human bispecific IgG, Nat Biotechnol. 1998 Jul;16(7):677-81).

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает CH3-домен одной тяжелой цепи, который имеет аминокислотные замены S354C/T366W, и CH3-домен другой тяжелой цепи, который имеет аминокислотные замены Y349C/T366S/L368A/Y407V.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает CH3-домен одной тяжелой цепи, который имеет аминокислотные замены Y349C/T366S/L368A/Y407, и CH3-домен другой тяжелой цепи, который имеет аминокислотные замены S354C/T366W.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околосмембранный домен МНС и второй околосмембранный домен МНС, которые, соответственно, представляют собой $\alpha 2$ домен МНС II и $\beta 2$ домен МНС II, и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околосмембранный домен МНС и второй околосмембранный домен МНС, которые, соответственно, представляют собой $\beta 2$ домен МНС II и $\alpha 2$ домен МНС II, и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает $\alpha 2$ домен МНС II, который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 38, и $\beta 2$ домен МНС II, который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 39.

SEQ ID NO: 30 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 2$ околосмембранного домена МНС класса II HLA-DM (HLA-DMA*01:01:01:01).

SEQ ID NO: 31 представляет собой аминокислотную последовательность последовательность $\beta 2$ околосмембранного домена МНС класса II HLA-DM (HLA-DMB*01:01:01:01).

SEQ ID NO: 32 представляет собой аминокислотную последовательность последовательность $\alpha 2$ околосмембранного домена МНС класса II HLA-DO (HLA-DOA*01:01:01:01).

SEQ ID NO: 33 представляет собой аминокислотную последовательность последовательность $\beta 2$ околосмембранного домена МНС класса II HLA-DO (HLA-DOB*01:01:01:01).

SEQ ID NO: 34 представляет собой аминокислотную последовательность последовательность $\alpha 2$ околосмембранного домена МНС класса II HLA-DP (HLA-DPA1*01:03:01:01).

SEQ ID NO: 35 представляет собой аминокислотную последовательность $\beta 2$ околосмембранного домена МНС класса II HLA-DP (HLA-DPB1*01:01:01:01).

SEQ ID NO: 36 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 2$ околосмембранного домена МНС класса II HLA-DQ (HLA-DQA1*01:01:01:01).

SEQ ID NO: 37 представляет собой аминокислотную последовательность $\beta 2$ околосмембранного домена МНС класса II HLA-DQ (HLA-DQB1*05:01:01:01).

SEQ ID NO: 38 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 2$ околосмембранного домена МНС 2 класса II HLA-DR (HLA-DRA*01:01:01:01).

SEQ ID NO: 39 представляет собой аминокислотную последовательность $\beta 2$ околосмембранного домена МНС класса HLA-DR (HLA-DRB1*01:01:01:01).

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околосмембранный домен МНС и второй околосмембранный домен МНС, которые, соответственно, представляют собой модифицированный вариант $\alpha 2$ домена МНС II и модифицированный вариант $\beta 2$ домена МНС II, и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околосмембранный домен

МНС и второй околомембранный домен МНС, которые, соответственно, представляют собой модифицированный вариант $\beta 2$ домена МНС II и модифицированный вариант $\alpha 2$ домена МНС II, и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околомембранный домен МНС и второй околомембранный домен МНС, которые, соответственно, представляют собой $\alpha 3$ домен МНС I и $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$), и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околомембранный домен МНС и второй околомембранный домен МНС, которые, соответственно, представляют собой $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$) и $\alpha 3$ домен МНС I, и образуют между собой гетеродимер.

$\beta 2$ микроглобулин представляет собой негликозилированный белок массой 12 кДа; одной из его функций является стабилизация α цепи МНС класса I, а также белков CD1 и HFE. В составе вышеуказанных белков $\beta 2$ микроглобулин человека имеет практически идентичную структуру и поэтому в описании данного изобретения $\beta 2$ микроглобулин человека упоминается без указания белка, в состав которого он входит.

В отличие от α цепи $\beta 2$ микроглобулин не пересекает мембрану. Локус $\beta 2$ микроглобулина человека находится на 15 хромосоме. Ген $\beta 2$ микроглобулина состоит из 4 экзонов и 3 интронов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает $\alpha 3$ домен МНС I, который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы SEQ ID NO: 1-29, и $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$), который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46.

SEQ ID NO: 1 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околомембранного домена МНС класса I HLA-A (аллель A*01:01:01:01).

SEQ ID NO: 2 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена МНС класса I HLA-A (A*02:01:01:01).

SEQ ID NO: 3 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена МНС класса I HLA-A (A*03:01:01:01).

SEQ ID NO: 4 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена МНС класса I HLA-A (A*11:01:01:01).

SEQ ID NO: 5 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена МНС класса I HLA-A (A*23:01:01:01).

SEQ ID NO: 6 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена МНС класса I HLA-B (B*07:02:01:01).

SEQ ID NO: 7 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена МНС класса I HLA-B (B*08:01:01:01).

SEQ ID NO: 8 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена МНС класса I HLA-B (B*13:01:01:01).

SEQ ID NO: 9 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена МНС класса I HLA-B (B*14:01:01:01).

SEQ ID NO: 10 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена МНС класса I HLA-B (B*15:01:01:01).

SEQ ID NO: 11 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена МНС класса I HLA-C (C*01:02:01:01).

SEQ ID NO: 12 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена МНС класса I HLA-C (C*03:02:01:01).

SEQ ID NO: 13 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена МНС класса I HLA-C (C*04:01:01:01).

SEQ ID NO: 14 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена МНС класса I HLA-C (C*05:01:01:01).

SEQ ID NO: 15 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена МНС класса I HLA-C (C*06:02:01:01).

SEQ ID NO: 16 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена МНС класса I HLA-E (E*01:01:01:01).

SEQ ID NO: 17 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена МНС класса I HLA-E (E*01:03:01:01).

SEQ ID NO: 18 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена МНС класса I HLA-E (E*01:05).

SEQ ID NO: 19 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена МНС класса I HLA-E (E*01:06).

SEQ ID NO: 20 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена МНС класса I HLA-E (E*01:09).

SEQ ID NO: 21 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена МНС класса I HLA-F (F*01:01:01:01).

SEQ ID NO: 22 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена МНС класса I HLA-F (F*01:02).

SEQ ID NO: 23 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена МНС класса I HLA-F (F*01:03:01:01).

SEQ ID NO: 24 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена МНС класса I HLA-F (F*01:04:01:01).

SEQ ID NO: 25 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена МНС класса I HLA-F (F*01:05).

SEQ ID NO: 26 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена МНС класса I HLA-G (G*01:01:01:01).

SEQ ID NO: 27 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена МНС класса I HLA-G (G*01:03:01:01).

SEQ ID NO: 28 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена МНС класса I HLA-G (G*01:04:01:01).

SEQ ID NO: 29 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена МНС класса I HLA-G (G*01:06).

SEQ ID NO: 46 представляет собой аминокислотную последовательность универсального $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$) МНС класса I или МНС-подобных белков (CD1, HFE).

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околочембранный домен МНС и второй околочембранный домен МНС, которые, соответственно, представляют собой модифицированный вариант $\alpha 3$ домена МНС I и модифицированный вариант $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$), и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околочембранный домен МНС и второй околочембранный домен МНС, которые, соответственно, представляют собой модифицированный вариант $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$) и модифицированный вариант $\alpha 3$ домена МНС I, и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает модифицированный вариант $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$), который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 48.

SEQ ID NO: 47 представляет собой аминокислотную последовательность универсального $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$) МНС класса I или МНС-подобных белков (CD1, HFE) с мутацией R12C (SS мостик внутри блока).

SEQ ID NO: 48 представляет собой аминокислотную последовательность универсального $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$) МНС класса I или МНС-подобных белков (CD1, HFE) с мутацией R12C (SS мостик внутри блока) + шарнир (hinge) с мутацией C220A (SS мостик убран с С-конца блока и перенесен внутрь блока).

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околочембранный домен МНС-подобного белка и второй околочембранный домен МНС-подобного белка, которые, соответственно, представляют собой $\alpha 3$ домен CD1 и $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$), и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околочембранный домен

МНС-подобного белка и второй околосмембранный домен МНС-подобного белка, которые, соответственно, представляют собой $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$) и $\alpha 3$ домен CD1, и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает $\alpha 3$ домен CD1, который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы SEQ ID NO: 40-44, и $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$), который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46.

SEQ ID NO: 40 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена CD1a.

SEQ ID NO: 41 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена CD1b.

SEQ ID NO: 42 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена CD1c.

SEQ ID NO: 43 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена CD1d.

SEQ ID NO: 44 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена CD1e.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околосмембранный домен МНС-подобного белка и второй околосмембранный домен МНС-подобного белка, которые, соответственно, представляют собой модифицированный вариант $\alpha 3$ домена CD1 и модифицированный вариант $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$), и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околосмембранный домен МНС-подобного белка и второй околосмембранный домен МНС-подобного белка, которые, соответственно, представляют собой модифицированный вариант $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$) и модифицированный вариант $\alpha 3$ домена CD1, и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает модифицированный вариант $\alpha 3$ домена CD1, который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы SEQ ID NO: 49-56 или SEQ ID NO: 109, и модифицированный вариант $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$), который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 48.

SEQ ID NO: 49 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена CD1b с мутацией N57C (дополнительный SS мостик внутри блока) и удлинением на 3 аминокислоты GSC на С-конце.

SEQ ID NO: 50 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена CD1b с мутацией N57C (SS мостик внутри блока) и удлинением на 2 аминокислоты GS на С-конце (SS мостик убран с С-конца блока и перенесен внутрь блока).

SEQ ID NO: 51 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена CD1b с мутацией N59A (Замена в предсказанном сайте N-гликозилирования) и удлинением на 3 аминокислоты GSC на С-конце.

SEQ ID NO: 52 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена CD1b с мутацией N59D (Замена в предсказанном сайте N-гликозилирования) и удлинением на 3 аминокислоты GSC на С-конце.

SEQ ID NO: 53 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена CD1b с мутациями N57C, N59A и удлинением на 3 аминокислоты GSC на С-конце (дополнительный SS-мостик внутри блока + убран предсказанный сайт N-гликозилирования).

SEQ ID NO: 54 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена CD1b с мутациями N57C, N59D и удлинением на 3 аминокислоты GSC на С-конце (дополнительный SS-мостик внутри блока + убран предсказанный сайт N-гликозилирования).

SEQ ID NO: 55 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена CD1b с мутациями N57C, N59A и удлинением на 2

аминокислоты GS на С-конце (SS мостик перенесен внутрь блока + убран предсказанный сайт N-гликозилирования).

SEQ ID NO: 56 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена CD1b с мутациями N57C, N59D и удлинением на 2 аминокислоты GS на С-конце (SS мостик перенесен внутрь блока + убран предсказанный сайт N-гликозилирования).

SEQ ID NO: 109 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена CD1b с удлинением на 3 аминокислоты GSC на С-конце.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околосмембранный домен МНС-подобного белка и второй околосмембранный домен МНС-подобного белка, которые, соответственно, представляют собой $\alpha 3$ домен HFE и $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$), и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околосмембранный домен МНС-подобного белка и второй околосмембранный домен МНС-подобного белка, которые, соответственно, представляют собой $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$) и $\alpha 3$ домен HFE, и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает $\alpha 3$ домен HFE, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$), который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46.

SEQ ID NO: 45 представляет собой аминокислотную последовательность $\alpha 3$ околосмембранного домена HFE.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околосмембранный домен МНС-подобного белка и второй околосмембранный домен МНС-подобного белка, которые, соответственно, представляют собой модифицированный вариант $\alpha 3$

домена HFE и модифицированный вариант $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$), и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает первый околосмембранный домен МНС-подобного белка и второй околосмембранный домен МНС-подобного белка, которые, соответственно, представляют собой модифицированный вариант $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$) и модифицированный вариант $\alpha 3$ домена HFE, и образуют между собой гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает модифицированный вариант $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$), который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 48.

Известны более 1000 охарактеризованных структур МНС, CD1 и HFE. Любая из вышеуказанных структур может быть использована в биспецифическом антителе по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает модифицированный вариант МНС или МНС-подобного белка, где под модифицированным вариантом подразумевается вариант, включающий замены на цистеин (C) для образования дисульфидного мостика между цепями гетеродимера, полученного из первого и второго околосмембранных доменов МНС или МНС-подобного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает модифицированный вариант МНС или МНС-подобного белка, где под модифицированным вариантом подразумевается вариант, включающий одну или более замен в различных позициях околосмембранных доменов МНС или МНС-подобного белка, приводящие к увеличению термодинамической стабильности T_m более чем на 1 градус Цельсия в сравнении с дикой формой околосмембранных доменов МНС или МНС-подобного белка, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает модифицированный вариант МНС или МНС-подобного белка, где под модифицированным вариантом подразумевается вариант, включающий одну или более замен в различных позициях околосмембранных доменов МНС или МНС-подобного белка, приводящие к уменьшению количества агрегатов на более чем 5% при концентрации выше 10 мг/ мл в сравнении с дикой формой околосмембранных доменов МНС или МНС-подобного белка, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает модифицированный вариант МНС или МНС-подобного белка, где под модифицированным вариантом подразумевается вариант, включающий одну или более замен в различных позициях околосмембранных доменов МНС или МНС-подобного белка, приводящие к удалению сайтов гликозилирования в сравнении с дикой формой околосмембранных доменов МНС или МНС-подобного белка, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает переменный домен первой легкой цепи и переменный домен второй легкой цепи, которые идентичны.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает Fc-фрагмент, который относится к IgG.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает Fc-фрагмент, который выбирают из группы: IgG1, IgG2, или IgG4 человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает мономер Fc-фрагмента, где дополнительно вводят замены, приводящие к отсутствию ADCC, CDC и/или ADCP свойств у двухвалентного биспецифического антитела.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает мономер Fc-фрагмента, где дополнительно вводят замены LALA (L234A и L235A).

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает мономер Fc-фрагмента, где дополнительно вводят замены, приводящие к пролонгированному действия антитела.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает мономер Fc-фрагмента, где дополнительно вводят замены YTE (M252Y, S254T и T256E).

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает мономер Fc-фрагмента, где дополнительно вводят замены, приводящие к усилению ADCC, CDC и/или ADCP свойств у двухвалентного биспецифического антитела.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело включает мономер Fc-фрагмента, где дополнительно вводят замену E345R.

Вышеуказанные мутации в Fc фрагменте пронумерованы согласно нумерации аминокислот цепей антител EU (Edelman G.M. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 1969, ee. 78- 85; Kabat E.A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991)».

Под мутациями в Fc-фрагменте предлагается модификация(и) аминокислотных последовательностей антител, описанных в настоящей заявке. Варианты аминокислотной последовательности антитела получают введением соответствующих изменений нуклеотидов в нуклеиновую кислоту антитела или пептидным синтезом. Такие модификации включают, например, делеции, и/или инсерции, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Осуществляют любое сочетание делеции,

инсерции и замены, чтобы получить конечную конструкцию, при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками.

Вариант модификации аминокислотных последовательностей антител с помощью аминокислотных замен представляет собой замену, по меньшей мере, одного аминокислотного остатка в молекуле антитела на другой остаток.

Консервативные замены показаны в таблице А под заголовком «предпочтительные замены».

Таблица А		
Исходный остаток	Примеры замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg(R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn(N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln(Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe(F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp(W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин	Leu

Понятие «эффекторная функция» антитела относится к видам биологической активности, связанным с Fc-областью (нативной последовательностью Fc-области или с вариантами аминокислотной последовательности Fc-области) антитела, и варьируют в зависимости от изотипа антитела. Примерами эффекторных функций антитела являются: Cl_q - связывание; комплементзависимая цитотоксичность; связывание Fc-рецептора; антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; понижающая регуляция рецепторов клеточной поверхности (например, В-клеточного рецептора, BCR) и В-клеточная активация.

«Антитело-зависимая клеточная цитотоксичность» или «ADCC» относится к опосредованному клетками ответу, при котором неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют рецепторы Fc (FcR) (например, природные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), узнают связанное антитело на клетке-мишени и затем вызывают лизис или фагоцитоз клетки-мишени. Первичные клетки для опосредования ADCC, NK-клетки, экспрессируют только Fc γ RIII, тогда как моноциты экспрессируют Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII. Экспрессия FcR на гематопоетических клетках суммирована в таблице 3 на странице 464 в публикации Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991). Чтобы оценить активность в ADCC представляющей интерес молекулы можно осуществить анализы ADCC *in vitro*, такие как анализы, описанные в патентах США № 5500362 или 5821337. Применимые эффекторные клетки для таких анализов включают моноклеарные клетки периферической крови (PBMC) и природные клетки-киллеры (NK). Альтернативно или дополнительно ADCC-активность представляющей интерес молекулы можно оценить *in vivo*, например, в животной модели, такой как модель, описанная в Clynes et al. *PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998).

«Эффекторными клетками человека» являются лейкоциты, которые экспрессируют один или несколько FcR и осуществляют эффекторные функции. Предпочтительно клетки экспрессируют, по меньшей мере, Fc γ RIII и осуществляют ADCC-эффекторную функцию. Примеры лейкоцитов человека, которые опосредуют ADCC, включают моноклеарные клетки периферической

крови (PBMC), природные клетки-киллеры (NK), моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы; при этом предпочтительны PBMC и NK-клетки. Эффекторные клетки могут быть выделены из их природного источника, например из крови или PBMC, как описано в настоящей публикации.

«Комплемент-зависимая цитотоксичность» и «CDC» относятся к способности молекулы лизировать мишень в присутствии комплемента. Путь активации комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с молекулой (например, антителом) в комплексе со своим антигеном. Чтобы оценить активацию комплемента можно осуществить анализ CDC, например, как описано в Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996).

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело специфически связывается с CD20 и CD3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело специфически связывается с BCMA и CD3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело специфически связывается с PD-L1 и CD47.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело специфически связывается с фактором свертывания крови 9 (FIX) и фактором свертывания крови 10 (FX).

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело специфически связывается с GD2 и CD3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело специфически связывается с AXL и CD3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентное биспецифическое химерное антитело специфически связывается с PD-L1 и TGF beta.

В материалах заявки приведены следующие антитела и антитело-подобные молекулы: 01-001, 01-002, 01-003, 01-004, 01-005, 01-006, 01-007, 01-008, 01-009,

01-010, 01-011, 01-012, 02-004, 02-005, 02-006, 02-007, 02-008, 02-009, 03-001, 03-002, 03-003, 03-004, 03-005, 03-006, 03-007, 03-008.

01-001 представляет собой модельную моноспецифическую антитело-подобную молекулу, которая включает тяжелую цепь на основе VH и CH1, а также легкую цепь на основе VL и CD1b, где VH представляет собой аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VH) с SEQ ID NO: 103, VL представляет собой аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи антитела антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VL) с SEQ ID NO: 104, а CD1b представляет собой $\alpha 3$ домен CD1b, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109.

01-002 представляет собой модельную моноспецифическую антитело-подобную молекулу, которая включает тяжелую цепь на основе VH и b2M, а также легкую цепь на основе VL и CK, где VH представляет собой аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VH) с SEQ ID NO: 103, b2M представляет собой $\beta 2$ микроглобулин, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, а VL представляет собой аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VL) с SEQ ID NO: 104.

01-003 представляет собой модельную моноспецифическую антитело-подобную молекулу, которая включает тяжелую цепь на основе VH и CH1, а также легкую цепь на основе VL и CD1b, где VH представляет собой аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела антитела Окрелизумаб (Ocrelizumab_VH) с SEQ ID NO: 105, VL представляет собой аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи антитела антитела Окрелизумаб (Ocrelizumab_VL) с SEQ ID NO: 106, а CD1b представляет собой $\alpha 3$ домен CD1b, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109.

01-004 представляет собой модельную моноспецифическую антитело-подобную молекулу, которая включает тяжелую цепь на основе VH и CH1, а также легкую цепь на основе VL и CK, где VH представляет собой аминокислотную

последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VH) с SEQ ID NO: 103, а VL представляет собой аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи антитела Окрелизумаб (Ocrelizumab_VL) с SEQ ID NO: 106.

01-005 представляет собой модельную моноспецифическую антитело-подобную молекулу, которая включает тяжелую цепь на основе VH и b2M, а также легкую цепь на основе VL и CD1b, где VH представляет собой аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VH) с SEQ ID NO: 103, b2M представляет собой β 2 микроглобулин, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, VL представляет собой аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи антитела Окрелизумаб (Ocrelizumab_VL) с SEQ ID NO: 106, а CD1b представляет собой α 3 домен CD1b, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109.

01-006 представляет собой модельную моноспецифическую антитело-подобную молекулу, которая включает тяжелую цепь на основе VH и CH1, а также легкую цепь на основе VL и CK, где VH представляет собой аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела Окрелизумаб (Ocrelizumab_VH) с SEQ ID NO: 105, а VL представляет собой аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VL) с SEQ ID NO: 104.

01-007 представляет собой модельную моноспецифическую антитело-подобную молекулу, которая включает тяжелую цепь на основе VH и b2M, а также легкую цепь на основе VL и CD1b, где VH представляет собой аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела Окрелизумаб (Ocrelizumab_VH) с SEQ ID NO: 105, b2M представляет собой β 2 микроглобулин, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, VL представляет собой аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VL) с SEQ ID NO: 104,

а CD1b представляет собой $\alpha 3$ домен CD1b, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109.

01-008 представляет собой модельную моноспецифическую антитело-подобную молекулу, которая включает тяжелую цепь на основе VH и CH1, а также легкую цепь на основе VL и CD1b, где VH представляет собой аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VH) с SEQ ID NO: 103, VL представляет собой аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи антитела антитела Окрелизумаб (Ocrelizumab_VL) с SEQ ID NO: 106, а CD1b представляет собой $\alpha 3$ домен CD1b, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109.

01-009 представляет собой модельную моноспецифическую антитело-подобную молекулу, которая включает тяжелую цепь на основе VH и b2M, а также легкую цепь на основе VL и CK, где VH представляет собой аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VH) с SEQ ID NO: 103, b2M представляет собой $\beta 2$ микроглобулин, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, а VL представляет собой аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи антитела Окрелизумаб (Ocrelizumab_VL) с SEQ ID NO: 106.

01-010 представляет собой модельную моноспецифическую антитело-подобную молекулу, которая включает тяжелую цепь на основе VH и CH1, а также легкую цепь на основе VL и CD1b, где VH представляет собой аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела Окрелизумаб (Ocrelizumab_VH) с SEQ ID NO: 105, VL представляет собой аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи антитела антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VL) с SEQ ID NO: 104, а CD1b представляет собой $\alpha 3$ домен CD1b, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109.

01-011 представляет собой модельную моноспецифическую антитело-подобную молекулу, которая включает тяжелую цепь на основе VH и b2M, а также легкую цепь на основе VL и CD1b, где VH представляет собой аминокислотную

последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VH) с SEQ ID NO: 103, b2M представляет собой β 2 микроглобулин, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, VL представляет собой аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VL) с SEQ ID NO: 104, а CD1b представляет собой α 3 домен CD1b, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109.

01-012 представляет собой модельную моноспецифическую антитело-подобную молекулу, которая включает тяжелую цепь на основе VH и CH1, а также легкую цепь на основе VL и CK, где VH представляет собой аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VH) с SEQ ID NO: 103, а VL представляет собой аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VL) с SEQ ID NO: 104.

02-004 представляет собой двухвалентное биспецифическое химерное антитело, которое специфически связывается с PD1 и CD20, и включает:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с PD1;

где первая легкая цепь содержит переменный домен легкой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VL) с SEQ ID NO: 104 и константный домен легкой цепи;

где первая тяжелая цепь содержит переменный домен тяжелой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VH) с SEQ ID NO: 103 и константные домены тяжелой цепи антитела, включающие первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи, при этом CH3 включает аминокислотные замены для образования Hole;

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с CD20,

где вторая легкая цепь содержит переменный домен легкой цепи антитела Окрелизумаб (Ocrelizumab_VL) с SEQ ID NO: 106 и околомембранный $\alpha 3$ домен CD1b, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109;

где вторая тяжелая цепь, содержит переменный домен тяжелой цепи антитела Окрелизумаб (Ocrelizumab_VH) с SEQ ID NO: 105, околомембранный домен $\beta 2$ микроглобулина, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи, при этом CH3 включает аминокислотные замены для образования Knob.

02-004 представляет собой двухвалентное биспецифическое химерное антитело, которое специфически связывается с PD1 и CD20, и включает:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с PD1;

где первая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 (Prolgolimab_VL_CK);

где первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 (Prolgolimab_VH_HC_hole);

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с CD20,

где вторая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60 (Ocrelizumab_VL_CD1b);

где вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 (Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob).

02-005 представляет собой двухвалентное биспецифическое химерное антитело, которое специфически связывается с PD1 и CD20, и включает:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с CD20;

где первая легкая цепь содержит переменный домен легкой цепи антитела Окрелизумаб (Ocrelizumab_VL) с SEQ ID NO: 106 и константный домен легкой цепи;

где первая тяжелая цепь содержит переменный домен тяжелой цепи антитела Окрелизумаб (Ocrelizumab_VH) с SEQ ID NO: 105 и константные домены тяжелой цепи антитела, включающие первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи, при этом CH3 включает аминокислотные замены для образования Hole;

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с PD1,

где вторая легкая цепь содержит переменный домен легкой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VL) с SEQ ID NO: 104 и околосмембранный $\alpha 3$ домен CD1b, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109;

где вторая тяжелая цепь, содержит переменный домен тяжелой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VH) с SEQ ID NO: 103, околосмембранный домен $\beta 2$ микроглобулина, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи, при этом CH3 включает аминокислотные замены для образования Knob.

02-005 представляет собой двухвалентное биспецифическое химерное антитело, которое специфически связывается с PD1 и CD20, и включает:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с CD20;

где первая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62 (Ocrelizumab_VL_CK);

где первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61 (Ocrelizumab_VH_HC_hole);

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с PD1,

где вторая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 (Prolgolimab_VL_CD1b);

где вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63 (Prolgolimab_VH_b2m_Fc_knob).

02-006 представляет собой двухвалентное биспецифическое химерное антитело, которое специфически связывается с PD1 и CSF1R, и включает:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с PD1;

где первая легкая цепь содержит переменный домен легкой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VL) с SEQ ID NO: 104 и константный домен легкой цепи;

где первая тяжелая цепь содержит переменный домен тяжелой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VH) с SEQ ID NO: 103 и константные домены тяжелой цепи антитела, включающие первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи, при этом CH3 включает аминокислотные замены для образования Hole;

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с CSF1R,

где вторая легкая цепь содержит переменный домен легкой цепи антитела к CSF1R с SEQ ID NO: 108 и околосмембранный $\alpha 3$ домен CD1b, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109;

где вторая тяжелая цепь, содержит переменный домен тяжелой цепи антитела к CSF1R с SEQ ID NO: 107, околосмембранный домен $\beta 2$ микроглобулина, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46 и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи, при этом CH3 включает аминокислотные замены для образования Knob.

02-006 представляет собой двухвалентное биспецифическое химерное антитело, которое специфически связывается с PD1 и CSF1R, и включает:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с PD1;

где первая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 (Prolgolimab_VL_CK);

где первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 (Prolgolimab_VH_HC_hole);

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с CSF1R,

где вторая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 (Анти-CSF1R_VL_CD1b);

где вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 (Анти-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob).

02-007 представляет собой двухвалентное биспецифическое химерное антитело, которое специфически связывается с PD1 и CSF1R, и включает:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с CSF1R;

где первая легкая цепь содержит переменный домен легкой цепи антитела к CSF1R с SEQ ID NO: 108 и константный домен легкой цепи;

где первая тяжелая цепь содержит переменный домен тяжелой цепи антитела к CSF1R с SEQ ID NO: 107 и константные домены тяжелой цепи антитела, включающие первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи, при этом CH3 включает аминокислотные замены для образования Hole;

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с PD1,

где вторая легкая цепь содержит переменный домен легкой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VL) с SEQ ID NO: 104 и околосмембранный $\alpha 3$ домен CD1b, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109;

где вторая тяжелая цепь, содержит переменный домен тяжелой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VH) с SEQ ID NO: 103, околосмембранный домен $\beta 2$ микроглобулина, который имеет аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 46, и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи, при этом CH3 включает аминокислотные замены для образования Knob.

02-007 представляет собой двухвалентное биспецифическое химерное антитело, которое специфически связывается с PD1 и CSF1R, и включает:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с CSF1R;

где первая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 (Анти-CSF1R_VL_CK);

где первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67 (Анти-CSF1R_VH_HC_hole);

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с PD1,

где вторая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 (Prolgolimab_VL_CD1b);

где вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63 (Prolgolimab_VH_b2m_Fc_knob).

02-008 представляет собой двухвалентное биспецифическое химерное антитело, которое специфически связывается с CD20 и CSF1R, и включает:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с CD20;

где первая легкая цепь содержит переменный домен легкой цепи антитела Окрелизумаб (Ocrelizumab_VL) с SEQ ID NO: 106 и константный домен легкой цепи;

где первая тяжелая цепь содержит переменный домен тяжелой цепи антитела Окрелизумаб (Ocrelizumab_VH) с SEQ ID NO: 105 и константные домены тяжелой цепи антитела, включающие первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи, при этом CH3 включает аминокислотные замены для образования Hole;

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с CSF1R,

где вторая легкая цепь содержит переменный домен легкой цепи антитела к CSF1R с SEQ ID NO: 108 и околочелюстной $\alpha 3$ домен CD1b, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109;

где вторая тяжелая цепь, содержит переменный домен тяжелой цепи антитела к CSF1R с SEQ ID NO: 107, околочелюстной домен $\beta 2$ микроглобулина, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи, при этом CH3 включает аминокислотные замены для образования Knob.

02-008 представляет собой двухвалентное биспецифическое химерное антитело, которое специфически связывается с CD20 и CSF1R, и включает:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с CD20;

где первая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62 (Ocrelizumab_VL_CK);

где первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61 (Ocrelizumab_VH_HC_hole);

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с CSF1R,

где вторая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 (Анти-CSF1R_VL_CD1b);

где вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 (Анти-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob).

02-009 представляет собой двухвалентное биспецифическое химерное антитело, которое специфически связывается с CD20 и CSF1R, и включает:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с CSF1R;

где первая легкая цепь содержит переменный домен легкой цепи антитела к CSF1R с SEQ ID NO: 108 и константный домен легкой цепи;

где первая тяжелая цепь содержит переменный домен тяжелой цепи антитела к CSF1R с SEQ ID NO: 107 и константные домены тяжелой цепи антитела, включающие первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи, при этом CH3 включает аминокислотные замены для образования Hole;

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с CD20,

где вторая легкая цепь содержит переменный домен легкой цепи антитела Окрелизумаб (Ocrelizumab_VL) с SEQ ID NO: 106 и околосмембранный $\alpha 3$ домен CD1b, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109;

где вторая тяжелая цепь, содержит переменный домен тяжелой цепи антитела Окрелизумаб (Ocrelizumab_VH) с SEQ ID NO: 105, околосмембранный домен $\beta 2$ микроглобулина, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи, при этом CH3 включает аминокислотные замены для образования Knob.

02-009 представляет собой двухвалентное биспецифическое химерное антитело, которое специфически связывается с CD20 и CSF1R, и включает:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с CSF1R;

где первая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 (Анти-CSF1R_VL_CK);

где первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67 (Анти-CSF1R_VH_HC_hole);

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с CD20,

где вторая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60 (Ocrelizumab_VL_CD1b);

где вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 (Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob).

03-001 представляет собой двухвалентное моноспецифическое химерное антитело, которое специфически связывается с PD1, и включает:

легкую цепь, которая содержит вариабельный домен легкой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VL) с SEQ ID NO: 104 и $\alpha 3$ околосмембранный домен CD1b с мутацией N57C (дополнительный SS мостик внутри блока) и удлинением на 3 аминокислоты GSC на C-конце, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49;

тяжелую цепь, которая содержит вариабельный домен тяжелой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VH) с SEQ ID NO: 103, околосмембранный домен $\beta 2$ микроглобулина с мутацией R12C, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи.

03-001 представляет собой двухвалентное моноспецифическое химерное антитело, которое специфически связывается с PD1, и включает:

легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72 и

тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69.

03-002 представляет собой двухвалентное моноспецифическое химерное антитело, которое специфически связывается с PD1, и включает:

легкую цепь, которая содержит вариабельный домен легкой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VL) с SEQ ID NO: 104 и $\alpha 3$ околосмембранный домен CD1b с мутацией N57C (SS мостик внутри блока) и удлинением на 2 аминокислоты GS на C-конце (SS мостик убран с C-конца блока и перенесен внутрь блока), который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50;

тяжелую цепь, которая содержит переменный домен тяжелой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VH) с SEQ ID NO: 103, околомембранный домен $\beta 2$ микроглобулина с мутацией R12C и шарниром (hinge) с мутацией C220A, которые имеют аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48 и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи.

03-002 представляет собой двухвалентное моноспецифическое химерное антитело, которое специфически связывается с PD1, и включает:

легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73 и

тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71.

03-003 представляет собой двухвалентное моноспецифическое химерное антитело, которое специфически связывается с PD1, и включает:

легкую цепь, которая содержит переменный домен легкой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VL) с SEQ ID NO: 104 и $\alpha 3$ околомембранный домен CD1b с мутацией N59A (Замена в предсказанном сайте N-гликозилирования на легкой цепи) и удлинением на 3 аминокислоты GSC на C-конце, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51;

тяжелую цепь, которая содержит переменный домен тяжелой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VH) с SEQ ID NO: 103, околомембранный домен $\beta 2$ микроглобулина, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи.

03-003 представляет собой двухвалентное моноспецифическое химерное антитело, которое специфически связывается с PD1, и включает:

легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74 и

тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

03-004 представляет собой двухвалентное моноспецифическое химерное антитело, которое специфически связывается с PD1, и включает:

легкую цепь, которая содержит переменный домен легкой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VL) с SEQ ID NO: 104 и $\alpha 3$ околосмембранный домен CD1b с мутацией N59D (Замена в предсказанном сайте N-гликозилирования на легкой цепи) и удлинением на 3 аминокислоты GSC на C-конце, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52;

тяжелую цепь, которая содержит переменный домен тяжелой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VH) с SEQ ID NO: 103, околосмембранный домен $\beta 2$ микроглобулина, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи.

03-004 представляет собой двухвалентное моноспецифическое химерное антитело, которое специфически связывается с PD1, и включает:

легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75 и

тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

03-005 представляет собой двухвалентное моноспецифическое химерное антитело, которое специфически связывается с PD1, и включает:

легкую цепь, которая содержит переменный домен легкой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VL) с SEQ ID NO: 104 и $\alpha 3$ околосмембранный домен CD1b с мутациями N57C, N59A и удлинением на 3 аминокислоты GSC на C-конце (дополнительный SS-мостик внутри блока + убран предсказанный сайт N-гликозилирования), который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53;

тяжелую цепь, которая содержит переменный домен тяжелой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VH) с SEQ ID NO: 103, околосмембранный домен $\beta 2$ микроглобулина с мутацией R12C, который имеет аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 47, и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи.

03-005 представляет собой двухвалентное моноспецифическое химерное антитело, которое специфически связывается с PD1, и включает:

легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76 и

тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69.

03-006 представляет собой двухвалентное моноспецифическое химерное антитело, которое специфически связывается с PD1, и включает:

легкую цепь, которая содержит переменный домен легкой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VL) с SEQ ID NO: 104 и $\alpha 3$ околочелющечный домен CD1b с мутациями N57C, N59D и удлинением на 3 аминокислоты GSC на C-конце (дополнительный SS-мостик внутри блока + убран предсказанный сайт N-гликозилирования), который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54;

тяжелую цепь, которая содержит переменный домен тяжелой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VH) с SEQ ID NO: 103, околочелющечный домен $\beta 2$ микроглобулина с мутацией R12C, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи.

03-006 представляет собой двухвалентное моноспецифическое химерное антитело, которое специфически связывается с PD1, и включает:

легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77 и

тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69.

03-007 представляет собой двухвалентное моноспецифическое химерное антитело, которое специфически связывается с PD1, и включает:

легкую цепь, которая содержит переменный домен легкой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VL) с SEQ ID NO: 104 и $\alpha 3$ околосмембранный домен CD1b с мутациями N57C, N59A и удлинением на 2 аминокислоты GS на С-конце (SS мостик перенесен внутрь блока + убран предсказанный сайт N-гликозилирования), который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55;

тяжелую цепь, которая содержит переменный домен тяжелой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VH) с SEQ ID NO: 103, околосмембранный домен $\beta 2$ микроглобулина с мутацией R12C и шарниром (hinge) с мутацией C220A, которые имеют аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи.

03-007 представляет собой двухвалентное моноспецифическое химерное антитело, которое специфически связывается с PD1, и включает:

легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78 и

тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71.

03-008 представляет собой двухвалентное моноспецифическое химерное антитело, которое специфически связывается с PD1, и включает:

легкую цепь, которая содержит переменный домен легкой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VL) с SEQ ID NO: 104 и $\alpha 3$ околосмембранный домен CD1b с мутациями N57C, N59D и удлинением на 2 аминокислоты GS на С-конце (SS мостик перенесен внутрь блока + убран предсказанный сайт N-гликозилирования), который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

тяжелую цепь, которая содержит переменный домен тяжелой цепи антитела Пролголимаб (Prolgolimab_VH) с SEQ ID NO: 103, околосмембранный домен $\beta 2$ микроглобулин с мутацией R12C и шарниром (hinge) с мутацией C220A, которые имеют аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48 и мономер

Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи.

03-008 представляет собой двухвалентное моноспецифическое химерное антитело, которое специфически связывается с PD1, и включает:

легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79 и

тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71.

Данные антитела приведены в иллюстративных целях для подтверждения работоспособности формата двухвалентного биспецифического химерного антитела по изобретению, а также неожиданных его свойств. Данные антитела не должны рассматриваться как каким-то образом ограничивающие двухвалентное биспецифическое химерное антитело по изобретению.

Параметры выхода продукта с правильной гетеродимерной сборкой двух разных тяжелых цепей и правильным спариванием двух разных легких цепей с соответствующими тяжелыми цепями не зависят от переменных фрагментов тяжелой и легкой цепей биспецифического химерного антитела и их специфичности к антигенам.

Двухвалентные биспецифические химерные антитела по изобретению могут применяться для лечения различных заболеваний, в частности, онкологических заболеваний, аутоиммунных заболеваний или заболеваний, которые связаны с нарушением свертывания крови (коагуляции).

Нуклеиновая кислота

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, которая кодирует любое из вышеуказанных двухвалентных биспецифических химерных антител или ее фрагментов.

Термины «нуклеиновая кислота», «нуклеиновая последовательность» или «нуклеиновокислотная последовательность», «полинуклеотид», «олигонуклеотид», «полинуклеотидная последовательность» и «нуклеотидная

последовательность», которые используются равнозначно в данном описании, обозначают четкую последовательность нуклеотидов, модифицированных или не модифицированных, определяющую фрагмент или участок нуклеиновой кислоты, содержащую или не содержащую неприродные нуклеотиды и являющуюся либо двухцепочечной ДНК или РНК, либо одноцепочечной ДНК или РНК, либо продуктами транскрипции указанных ДНК.

Здесь также следует упомянуть, что данное изобретение не относится к нуклеотидным последовательностям в их природной хромосомной среде, т.е. в природном состоянии. Последовательности данного изобретения были выделены и/или очищены, т.е. были взяты прямо или косвенно, например, путем копирования, при этом их среда была по меньшей мере частично модифицирована. Таким образом, также здесь следует подразумевать изолированные нуклеиновые кислоты, полученные путем генетической рекомбинации, например, с помощью принимающих клеток (клеток-хозяев), или полученные путем химического синтеза.

Ссылка на нуклеотидную последовательность охватывает его комплимент, если не указано иное. Таким образом, ссылка на нуклеиновую кислоту, имеющую определенную последовательность следует понимать как охватывающие ее комплементарную цепь с ее комплементарной последовательностью.

В любом из указанных выше вариантов осуществления изобретения молекулы нуклеиновых кислот могут быть выделенными.

«Выделенная» молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена от по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты-примеси, с которой она обычно связана в естественном источнике нуклеиновой кислоты антитела. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты отличается от той формы или набора, в которых она находится в естественных условиях. Таким образом, выделенная молекула нуклеиновой кислоты отличается от молекулы нуклеиновой кислоты, существующей в клетках в естественных условиях.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-79 или SEQ ID NO: 109. Молекула нуклеиновой кислоты может также содержать любую комбинацию указанных нуклеотидных последовательностей.

В некоторых вариантах нуклеиновая кислота представляет собой ДНК.

В одном из вариантов настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность легкой или тяжелой цепи вышеуказанного биспецифического антитела по изобретению, выбранную из:

аминокислотной последовательности первой легкой цепи, которая содержит переменный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи;

аминокислотной последовательности первой тяжелой цепи, которая содержит переменный домен тяжелой цепи и константные домены тяжелой цепи антитела, включающие первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи;

аминокислотной последовательности второй легкой цепи, которая содержит переменный домен легкой цепи и константный домен, который выбирают из группы:

первого околомембранного домена MHC (главный комплекс гистосовместимости) или

первого околомембранного домена MHC-подобного белка;

аминокислотной последовательности второй тяжелой цепи, которая содержит переменный домен тяжелой цепи, константный домен, который выбирают из группы:

второго околомембранного домена MHC (главный комплекс гистосовместимости) или

второго околомембранного домена MHC-подобного белка,

и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи.

Молекула нуклеиновой кислоты может также содержать любую комбинацию указанных выше нуклеотидных последовательностей.

Специалисту в данной области будет очевидно, что пептид с аминокислотной последовательностью легкой или тяжелой цепи вышеуказанного биспецифического антитела по изобретению, выбранной из:

аминокислотной последовательности первой легкой цепи, которая содержит переменный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи;

аминокислотной последовательности первой тяжелой цепи, которая содержит переменный домен тяжелой цепи и константные домены тяжелой цепи антитела, включающие первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи;

аминокислотной последовательности второй легкой цепи, которая содержит переменный домен легкой цепи и константный домен, который выбирают из группы:

первого околомембранного домена MHC (главный комплекс гистосовместимости) или

первого околомембранного домена MHC-подобного белка;

аминокислотной последовательности второй тяжелой цепи, которая содержит переменный домен тяжелой цепи, константный домен, который выбирают из группы:

второго околомембранного домена MHC (главный комплекс гистосовместимости) или

второго околомембранного домена MHC-подобного белка,

и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи,

может быть кодирован широким рядом различных ДНК-последовательностей с учетом вырожденности генетического кода. Специалистам

в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие вариантные ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

Молекула нуклеиновой кислоты по данному изобретению может быть выделена из любого источника, который продуцирует биспецифическое антитело по изобретению. В определенных вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты по данному изобретению может быть синтезирована, а не выделена.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность первой тяжелой цепи кандидатов 02-004 и 02-006 (Prolgolimab_VH_HC_hole), и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 80.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность первой легкой цепи кандидатов 02-004 и 02-006 (Prolgolimab_VL_CK), и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 81.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность второй тяжелой цепи кандидатов 02-004 и 02-009 (Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob), и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 82.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность второй легкой цепи кандидатов 02-004 и 02-009 (Ocrelizumab_VL_CD1b), и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 83.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность первой тяжелой цепи кандидатов 02-005 и 02-008 (Ocrelizumab_VH_HC_hole), и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 84.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность первой легкой цепи кандидатов 02-005 и 02-008 (Ocrelizumab_VL_CK), и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 85.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность второй тяжелой цепи кандидатов 02-005 и 02-007 (Prolgolimab_VH_b2m_Fc_knob), и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 86.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность второй легкой цепи кандидатов 02-005 и 02-007 (Prolgolimab_VL_CD1b), и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 87.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность второй тяжелой цепи кандидатов 02-006 и 02-008 (Анти-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob), и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 88.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность второй легкой цепи кандидатов 02-006 и 02-008 (Анти-CSF1R_VL_CD1b), и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 89.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность первой тяжелой цепи кандидатов 02-007 и 02-009 (Анти-CSF1R_VH_HC_hole), и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 90.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность первой легкой цепи кандидатов 02-007 и 02-009 (Анти-CSF1R_VL_CK), и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 91.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность тяжелой цепи кандидатов 03-001 и 03-005, которая содержит универсальный $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$) с мутацией R12C, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 92.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность тяжелой цепи кандидатов 03-003 и 03-004, которая содержит универсальный $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$), и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 93.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность тяжелой цепи кандидатов 03-002, 03-007 и 03-008, которая содержит универсальный $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$) с мутацией R12C и шарнир (hinge) с мутацией C220A, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 94.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность легкой цепи кандидата 03-001, которая содержит $\alpha 3$ околосмембранный домен CD1b с мутацией N57C и удлинением на 3 аминокислоты GSC на С-конце, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 95.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность легкой цепи кандидата 03-002, которая содержит $\alpha 3$ околосмембранный домен CD1b с мутацией N57C и удлинением на 2 аминокислоты GS на С-конце, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 96.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность легкой цепи кандидата 03-003, которая содержит $\alpha 3$ околосмембранный домен CD1b с мутацией N59A и удлинением на 3 аминокислоты GSC на С-конце, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 97.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность легкой цепи кандидата 03-004, которая содержит $\alpha 3$ околосмембранный домен CD1b с мутацией N59D и удлинением на 3 аминокислоты GSC на С-конце, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 98.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность легкой цепи кандидата 03-005, которая содержит $\alpha 3$ околосмембранный домен CD1b с мутациями N57C, N59A и удлинением на 3 аминокислоты GSC на С-конце, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 99.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность легкой цепи кандидата 03-006, которая содержит $\alpha 3$ околосмембранный домен CD1b с мутациями N57C, N59D и удлинением на 3 аминокислоты GSC на С-конце, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 100.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность легкой цепи кандидата 03-007, которая содержит $\alpha 3$

околомембранный домен CD1b с мутациями N57C, N59A и удлинением на 2 аминокислоты GS на С-конце, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 101.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность легкой цепи кандидата 03-008, которая содержит $\alpha 3$ околомембранный домен CD1b с мутациями N57C, N59D и удлинением на 2 аминокислоты GS на С-конце, и включает нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 102.

Молекулы нуклеиновой кислоты могут использоваться для экспрессии двухвалентных биспецифических химерных антител по изобретению.

Экспрессионный вектор

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору, содержащему вышеуказанную выделенную нуклеиновую кислоту. Настоящее изобретение относится к вектору, подходящему для экспрессии любой из нуклеотидных последовательностей, описанных в настоящем документе.

Термин «вектор» при использовании в настоящем документе означает молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она соединена. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой плазмиду, т.е. кольцевую двуцепочечную часть ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. В некоторых вариантах осуществления изобретения векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный сайт инициации репликации и эписомные векторы млекопитающих). В других вариантах осуществления изобретения векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы

в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина, и таким образом реплицируются вместе с геном хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально соединены. Такие векторы упоминаются в данном документе как «рекомбинантные экспрессирующие векторы» (или просто «экспрессирующие векторы» («вектор экспрессии» или «экспрессионный вектор»)).

Настоящее изобретение относится к векторам, содержащим вышеуказанные молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют любое из вышеуказанных двухвалентных биспецифических антител или его конструктивных частей, выбранных из:

аминокислотной последовательности первой легкой цепи, которая содержит переменный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи;

аминокислотной последовательности первой тяжелой цепи, которая содержит переменный домен тяжелой цепи и константные домены тяжелой цепи антитела, включающие первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи;

аминокислотной последовательности второй легкой цепи, которая содержит переменный домен легкой цепи и константный домен, который выбирают из группы:

первого околомембранного домена MHC (главный комплекс гистосовместимости) или

первого околомембранного домена MHC-подобного белка;

аминокислотной последовательности второй тяжелой цепи, которая содержит переменный домен тяжелой цепи, константный домен, который выбирают из группы:

второго околомембранного домена MHC (главный комплекс гистосовместимости) или

второго околомембранного домена MHC-подобного белка,

и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи, как описано в настоящем документе.

Экспрессионные векторы включают плазмиды, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы (AAV), вирусы растений, такие как вирус мозаики цветной капусты, вирусы табачной мозаики, космиды, YAC, EBV полученные эписомы и тому подобное. Молекулы ДНК могут быть лигированы в вектор таким образом, что последовательности, контролирующие транскрипцию и трансляцию в векторе, выполняют предусмотренную функцию регуляции транскрипции и трансляции ДНК. Экспрессионный вектор и последовательности контроля экспрессии могут быть выбраны таким образом, чтобы быть совместимыми с используемой экспрессирующей клеткой-хозяином. Молекулы ДНК, кодирующие частично или по всей длине последовательности первого и второго связывающих доменов (например, последовательности тяжелой и легкой цепи, где связывающий домен содержит последовательность тяжелой и легкой цепи) могут быть введены в отдельные векторы. В одном варианте осуществления изобретения любая комбинация указанных выше молекул ДНК вводится в тот же экспрессионный вектор. Молекулы ДНК могут быть введены в экспрессионный вектор стандартными способами (например, лигированием комплементарных сайтов рестрикции на фрагменте гена антитела и вектора или лигированием тупых концов, если сайты рестрикции отсутствуют).

В некоторых вариантах осуществления изобретения подходящим вектором является тот, который включает места рестрикции так, что любая последовательность VH или VL может быть легко включена и экспрессирована, как описано выше. Прекращение полиаденилирования и транскрипции может произойти вниз по ходу сайта нативной хромосомы кодируемых участков. Рекомбинантный экспрессионный вектор также может кодировать сигнальный пептид, который облегчает выработку цепочки антитела клеткой-хозяином. Ген цепочки антитела может быть клонирован в вектор таким образом, что сигнальный пептид соединен с рамкой считывания аминоконца цепи иммуноглобулина.

Сигнальным пептидом может быть сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (то есть, сигнальный пептид белка не иммуноглобулиновой природы).

В некоторых вариантах осуществления изобретения помимо цепочки генов антител, рекомбинантная экспрессия векторов по данному изобретению может нести регулирующие последовательности, которые контролируют экспрессию генов цепи антител в клетке-хозяине. Специалистам в этой области будет понятно, что дизайн экспрессионного вектора, включая выбор регулирующих последовательностей, может зависеть от таких факторов, как селекция клетки-хозяина для трансформации, уровень экспрессии желаемого белка, и т.д. Предпочтительные регулирующие последовательности для экспрессирующей клетки-хозяина млекопитающих включают вирусные элементы обеспечивающие высокий уровень экспрессии белков в клетках млекопитающих, таких как промоторы и/или энхансеры, полученные из ретровирусной LTR, цитомегаловируса (CMV) (например, CMV промотора/энхансера), обезьяньего вируса 40 (SV40) (например, SV40 промотора/энхансера), аденовируса, (например, большого позднего промотора аденовируса (AdMLP)), вирус полиомы, а также сильных промоторов млекопитающих, таких как промотор нативных иммуноглобулинов или промотор актина. Методы экспрессии полипептидов в бактериальных клетках или клетках грибов, например, дрожжевых клетках, также хорошо известны в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления изобретения в дополнение к генам цепи антитела и регулирующим последовательностям, рекомбинантные векторы экспрессии изобретения могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации) и гены селектируемого маркера. Ген селектируемого маркера облегчает селекцию клеток-хозяев, в которые был введен вектор.

В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор может включать последовательность контроля экспрессии. Термин «последовательность контроля

экспрессии», используемый в данном описании, означает полинуклеотидные последовательности, которые необходимы для воздействия на экспрессию и процессинг кодирующих последовательностей, к которым они лигированы. Контролирующие экспрессию последовательности включают соответствующие последовательности инициации транскрипции, терминации, промотора и энхансера; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сплайсинг и сигналы полиаденилирования; последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т.е. консенсусная последовательность Козака); последовательности, которые повышают стабильность белка; и, при желании, последовательности, которые усиливают секрецию белка. Характер таких контролирующих последовательностей различается в зависимости от организма-хозяина; в прокариотах такие контролирующие последовательности, как правило, включают промотор, сайт связывания рибосомы, а также последовательности терминации транскрипции; в эукариотах, как правило, такие контролирующие последовательности включают промоторы и последовательности терминации транскрипции. Термин «контролирующие последовательности» включает, как минимум, все компоненты, наличие которых имеет важное значение для экспрессии и процессинга, и может также включать дополнительные компоненты, чье присутствие является полезным, например, лидирующие последовательности и последовательности слившихся клеток.

Клетки-хозяева и способ их получения

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения клетки-хозяина для получения любого из вышеуказанных двухвалентных биспецифических химерных антител и включает трансформирование клетки вышеуказанным экспрессионным вектором.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к клетке-хозяину для получения любого из вышеуказанных двухвалентных биспецифических химерных антител, которая содержит любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот.

Термин «рекомбинантная клетка-хозяин» (или просто «клетка-хозяин») при использовании в данном документе означает клетку, в которую введен рекомбинантный экспрессионный вектор. Настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, которые могут включать, например, вектор в соответствии с настоящим изобретением, описанным выше.

Настоящее изобретение относится также к клеткам-хозяевам, которые включают, например, нуклеотидную последовательность, кодирующую первую тяжелую цепь двухвалентного биспецифического химерного антитела по изобретению, нуклеотидную последовательность, кодирующую первую легкую цепь двухвалентного биспецифического химерного антитела по изобретению, нуклеотидную последовательность, кодирующую вторую тяжелую цепь двухвалентного биспецифического химерного антитела по изобретению или нуклеотидную последовательность, кодирующую вторую легкую цепь двухвалентного биспецифического химерного антитела по изобретению или все четыре вышеуказанные последовательности. Следует понимать, что «рекомбинантная клетка-хозяин» и «клетка-хозяин» означают не только конкретную заявленную клетку, но также и потомство такой клетки. Поскольку модификации могут проходить в последующих поколениях вследствие мутации или воздействий окружающей среды, такое потомство не может, на самом деле, быть идентичным родительской клетке, но такие клетки по-прежнему включены в объем термина «клетка-хозяин» при использовании в настоящем документе.

Молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность легкой или тяжелой цепи вышеуказанного биспецифического антитела, выбранную из:

аминокислотной последовательности первой легкой цепи, которая содержит переменный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи;

аминокислотной последовательности первой тяжелой цепи, которая содержит переменный домен тяжелой цепи и константные домены тяжелой цепи антитела, включающие первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер

Fc-фрагмента, содержащий второй (CH₂) и третий (CH₃) константные домены тяжелой цепи;

аминокислотной последовательности второй легкой цепи, которая содержит переменный домен легкой цепи и константный домен, который выбирают из группы:

первого околомембранного домена МНС (главный комплекс гистосовместимости) или

первого околомембранного домена МНС-подобного белка;

аминокислотной последовательности второй тяжелой цепи, которая содержит переменный домен тяжелой цепи, константный домен, который выбирают из группы:

второго околомембранного домена МНС (главный комплекс гистосовместимости) или

второго околомембранного домена МНС-подобного белка;

и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH₂) и третий (CH₃) константные домены тяжелой цепи,

и векторы, содержащие эти молекулы нуклеиновой кислоты, могут быть использованы для трансфекции подходящего млекопитающего или его клетки, растения или его клетки, бактериальной или дрожжевой клетки-хозяина. Преобразование может происходить любым известным способом для введения полинуклеотидов в клетку хозяина. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области и включают декстран опосредованную трансфекцию, трансфекцию комплексом нуклеиновой кислоты и позитивно заряженного полимера, трансфекцию преципитатом нуклеиновой кислоты и фосфата кальция, полибрен опосредованную трансфекцию, слияние протопластов, трансфекцию инкапсулированными в липосомы полинуклеотидами и прямую микроинъекцию ДНК в ядра. В дополнение молекулы нуклеиновых кислот могут быть введены в клетки млекопитающих вирусными векторами.

Клеточные линии млекопитающих, используемые в качестве хозяев для трансформации, хорошо известны в данной области и включают множество иммортализованных доступных клеточных линий. К ним относятся, например, клетки яичников китайского хомячка (CHO), NS0 клетки, клетки SP2, HEK-293T клетки, 293 Фристайл клетки (Invitrogen), NIH-3T3 клетки, клетки HeLa, клетки почек хомячка (BHK), клетки почек африканских зеленых мартышек (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Hep G2), A549 клетки и ряд других клеточных линий. Клеточные линии выбираются путем определения, какие клеточные линии имеют высокие уровни экспрессии и обеспечивают необходимые характеристики продуцируемого белка. Другими клеточными линиями, которые могут быть использованы, являются клеточные линии насекомых, такие как Sf9 или Sf21 клетки. Когда векторы рекомбинантной экспрессии, кодирующие вышеуказанное биспецифическое антитело или его часть, вводятся в клетки-хозяева млекопитающих, вышеуказанное биспецифическое антитело продуцируется путем культивирования клеток-хозяев в течение времени, достаточного для экспрессии вышеуказанного биспецифического антитела по изобретению в клетках-хозяевах или, предпочтительнее, выделения вышеуказанного биспецифического антитела в питательную среду, в которой выращиваются клетки-хозяева. Вышеуказанное биспецифическое антитело может быть выделено из питательной среды с использованием стандартных методов очистки белка. Клетки-хозяева растений, например, включают *Nicotiana*, *Arabidopsis*, ясню, кукурузу, пшеницу, картофель и т.д. Клетки бактерий хозяина включают виды *Escherichia* и *Streptomyces*. Дрожжевые клетки-хозяева включают *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*.

Кроме того, уровень продукции биспецифического антитела по данному изобретению из продуцирующей клеточной линии можно усилить с помощью ряда известных методов. Например, система экспрессии гена глутамин синтетазы (система GS) является достаточно распространенной для усиления экспрессии при определенных условиях. Система GS обсуждается в целом или частично в связи с патентами EP 0216846, 0256055, 0323997 и 0338841.

Вполне вероятно, что биспецифическое химерное антитело по изобретению в различных клеточных линиях или клетках-хозяевах будут отличаться друг от друга профилем гликозилирования. Однако биспецифическое антитело, описанное в данном документе, является частью данного изобретения, независимо от состояния гликозилирования связывающих молекул и в целом, независимо от наличия или отсутствия посттрансляционных модификаций.

Вышеуказанная клетка-хозяин не относится к клетке-хозяину, полученной с использованием человеческих эмбрионов.

Вышеуказанная клетка-хозяин не относится к клетке-хозяину, полученной с модификации генетической целостности клеток зародышевой линии человека.

Способ получения антитела

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения любого из вышеуказанных двухвалентных биспецифических химерных антител, который включает следующие этапы:

а) трансформация клетки-хозяина

- экспрессионными векторами, которые содержат молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие первую легкую цепь и первую тяжелую цепь двухвалентного биспецифического химерного антитела по изобретению,

- экспрессионными векторами, которые содержат молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь двухвалентного биспецифического химерного антитела по изобретению,

б) культивирование клетки-хозяина в условиях, которые позволяют синтезировать указанное двухвалентное биспецифическое антитело; и

в) выделение указанного двухвалентного биспецифического антитела из культуры клеток.

Настоящего изобретения относится к способам получения двухвалентных биспецифических химерных антител по данному изобретению. Один вариант осуществления изобретения относится к способу получения двухвалентных биспецифических химерных антител как определено в настоящем документе,

содержащему получение рекомбинантной клетки-хозяина, способной экспрессировать двухвалентное биспецифическое химерное антитело, культивированию указанной клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии двухвалентных биспецифических химерных антител, и выделение полученных двухвалентных биспецифических химерных антител. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело, полученное такой экспрессией в таких рекомбинантных клетках-хозяевах упоминается в данном документе как «двухвалентное биспецифическое химерное антитело».

Примеры

Для наилучшего понимания изобретения приводятся следующие примеры. Эти примеры приведены только в иллюстративных целях и не должны толковаться как ограничивающие сферу применения изобретения в любой форме.

Все публикации, патенты и патентные заявки, указанные в этой спецификации включены в данный документ путем отсылки. Хотя вышеупомянутое изобретение было довольно подробно описано путем иллюстрации и примера в целях исключения двусмысленного толкования, специалистам в данной области на основе идей, раскрытых в данном изобретении, будет вполне понятно, что могут быть внесены определенные изменения и модификации без отклонения от сущности и объема прилагаемых вариантов осуществления изобретения.

Материалы и общие методы

Методы рекомбинантной ДНК

Для манипуляций с ДНК использовали стандартные методы, описанные у Sambrook J. и др., *Molecular cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Реагенты для молекулярной биологии использовали согласно инструкциям производителей.

Синтез генов

Требуемые сегменты генов получали из олигонуклеотидов, созданных путем химического синтеза. Генные сегменты длиной от 300 до 4000 п.н., которые фланкированы уникальными сайтами рестрикции, собирали путем отжига и лигирования олигонуклеотидов, включая ПЦР-амплификацию и последующее клонирование через указанные сайты рестрикции. Последовательности ДНК субклонированных генных фрагментов подтверждали путем секвенирования ДНК.

Определение последовательностей ДНК

Последовательности ДНК определяли путем секвенирования по Сэнгеру.

Анализ последовательностей ДНК и белков и обработка данных о последовательностях

Применяли пакет программ Ylab2 (Биокад) для создания, картирования, анализа, аннотирования и иллюстрации последовательностей.

Экспрессионные векторы

Для кратковременной экспрессии описанных антител, антитело-подобных белков и антигенов в клетках эукариот (например, в клетках CHO) применяли экспрессионные варианты плазмид. Помимо кассеты экспрессии целевого белка плазмиды (векторы) содержали: сайт инициации репликации, обеспечивающий репликацию указанной плазмиды в *E.coli*, гены, придающие устойчивость в *E.coli* к различным антибиотикам (например, к ампициллину и канамицину).

Слияние генов, содержащих описанные цепи антитела, как указано выше, осуществляли с помощью ПЦР и/или синтеза и сборки генов с использованием известных методов и процедур путем соединения соответствующих сегментов нуклеиновых кислот, например, с использованием уникальных сайтов рестрикции в соответствующих векторах. Субклонированные нуклеотидные последовательности подтверждали секвенированием ДНК. Необходимые количества плазмид для транзientной трансфекции нарабатывали в культурах клеток *E.coli* и выделяли с помощью известных методик.

Наработка и очистка рекомбинантных антигенов в суспензионной культуре клеток млекопитающих

Рекомбинантные белки продуцировали в клетках постоянной клеточной линии, полученной из клеток яичника китайского хомячка (линия CHO). Суспензионное культивирование осуществляли в колбах на орбитальном шейкере-инкубаторе, с использованием бессывороточных сред с добавлением 8 mM L-глутамина и 1 г/л плуроника 68. Для транзientной экспрессии клетки в концентрации $2-2,2 \times 10^6$ кл/мл трансфецировали с помощью линейного полиэтиленимина. Через 9 дней после трансфекции культуральную жидкость отделяли от клеток фильтрацией через глубинный фильтр с размером пор 0,5/0,22 мкм.

Белки с гистидиновым тагом очищали путем металл-хелатной хроматографии. Очищенные белки фильтровали через 0.22 мкм и хранили при -70°C .

Чистоту полученного раствора белка оценивали с помощью SDS-гель-электрофореза, электрофорез проводили в денатурирующем 12% ПААГ с добавлением меркаптоэтанола и нативном 8% ПААГ.

Продукция антител и антитело-подобных белков в суспензионной культуре клеток млекопитающих

Контрольные антитела, биспецифические химерные антитела по изобретению и антитело-подобные белки продуцировали в клетках постоянной клеточной линии, полученной из клеток яичника китайского хомячка (линия CHO). Суспензионное культивирование осуществляли в колбах на орбитальном шейкере-инкубаторе, с использованием бессывороточных сред с добавлением 8 mM L-глутамина и 1 г/л плуроника 68. Для транзientной экспрессии клетки в концентрации $2-2,2 \times 10^6$ кл/мл трансфецировали с помощью линейного полиэтиленимина. Соотношение ДНК/ПЭИ составляло 1:3/1:10. Через 9 дней после трансфекции культуральную жидкость отделяли от клеток фильтрацией через

глубинный фильтр с размером пор 0,5/0,22 мкм, а затем проводили измерение титра белка на ForteBio по стандартной методике. Осветленную культуральную жидкость пропускали через колонку с аффинным сорбентом Protein A в нагрузке 10-20 мг на мл сорбента, уравновешенную фосфатно-солевым буфером (ФСБ, pH 7,4). Затем колонку промывали 5 колоночными объемами ФСБ, чтобы удалить неспецифически связывающиеся компоненты. Связанный белок элюировали, используя 0,1 М глициновый буфер pH 3. Главный протеиновый пик элюции собирали и доводили его pH до значений 6,8 – 7,0 с помощью 1 М буфера Tris-HCl (pH 8). Все стадии проводили при скорости потока 110 см/ч. Далее белок переводили в ФСБ (pH 7,4) с помощью диализа, фильтровали (0,22 мкм), переносили в пробирки и хранили при -70°C.

Чистоту полученного раствора белка оценивали с помощью SDS-гель-электрофореза в редуцирующих и нередуцирующих условиях, а также с помощью эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ЭВЭЖХ).

ЭВЭЖХ проводили на колонке TSK-Gel G3000SWXL, 7.8x300 мм, размер частиц 5 мкм, размер пор 250Å и предколонке TSK-Gel Guard SWxl.

Пример 1. Выбор замены для CH1/CK доменов в биспецифическом антителе

Для корректной гетеродимеризации тяжёлых и лёгких цепей в биспецифическом антителе одна из двух пар CH1/CK доменов заменялась на структурно схожие домены из других белков (фиг. 1). Выбор подходящих для замены доменов включал в себя три этапа:

- 1) подготовка трехмерной модели доменов CH1/CK;
- 2) Структурное выравнивание трехмерных моделей CH1/CK доменов со всеми объектами базы данных Protein Data Bank (www.rcsb.org) за исключением антител и Т-клеточных рецепторов;
- 3) Выбор подходящей замены по результатам структурного выравнивания на основе метрики RMSD и числа аминокислот, образующих идентичные элементы вторичной структуры

Первый этап — подготовка трехмерной модели доменов CH1/CK — представляет собой достраивание недостающих атомов в CH1/CK доменах из структуры PDBid 4nvl с помощью утилиты Prepwizard из пакета программ Schrodinger Suite. На втором этапе полученную модель поочередно выравнивали на все структуры из Protein Data Bank (за исключением антител и Т-клеточных рецепторов) с помощью утилиты Protein Structure Alignment из пакета программ Schrodinger Suite. Степень сходства произвольной структуры с моделью CH1/CK доменов оценивали по двум метрикам: 1) RMSD, отражающей среднеквадратичное отклонение атомов одной структуры от другой (расчет проводился по атомам остова полипептидной цепи), 2) количество аминокислот, образующих по итогам выравнивания идентичные элементы вторичной структуры белка. Лучшие результаты выравнивания по метрике RMSD представлены в таблице 1.

Таблица 1. Структуры из PDB, показавшие наилучшее качество выравнивания на CH1/CK домены антитела человека по метрике RMSD. PdbID — идентификатор структуры в базе данных PDB; RMSD — среднеквадратичное отклонение атомов структуры от атомов модели CH1/CK доменов; название структуры — заголовок из базы данных PDB

pdbID	Аминокислоты из идентичных вторичных структур	RMSD, Å	Название структуры	Тип белка
1ktd	101	3.253	CRYSTAL STRUCTURE OF CLASS II MHC MOLECULE IEK BOUND TO PIGEON CYTOCHROME C PEPTIDE	МНС класс II
4mdj	101	3.269	Immune Receptor	МНС класс II
3qxd	101	3.526	F54C HLA-DR1 bound with CLIP peptide	МНС класс II
1d5x	101	3.551	X-RAY CRYSTAL STRUCTURE OF HLA-	МНС класс II

			DR4 COMPLEXED WITH DIPEPTIDE MIMETIC AND SEB	
5wl1	103	3.585	Crystal Structure of Human CD1b in Complex	МНС-подобный белок CD1b
1gzq	102	3.594	CD1b in complex with Phosphatidylinositol	МНС-подобный белок CD1b
6c15	103	3.607	CD1c in complex with phosphatidylcholine	МНС-подобный белок CD1c
5j1a	108	3.639	Antigen presenting molecule	МНС-подобный белок CD1a
4mx7	106	3.647	Structure of mouse CD1d in complex with dioleoyl-phosphatidic acid	МНС-подобный белок CD1d
4i0p	101	3.689	HLA-DO in complex with HLA-DM	МНС класс II
1bx2	105	3.690	CRYSTAL STRUCTURE OF HLA-DR2 (DRA*0101,DRB1*1501) COMPLEXED WITH A PEPTIDE FROM HUMAN MYELIN BASIC PROTEIN	МНС класс II
4e0r	108	3.739	Structure of the chicken MHC class I molecule BF2*0401	МНС класс I
5tw5	101	3.794	Structure of mouse CD1d with bound glycosphingolipid JJ112	МНС-подобный белок CD1d
3gmo	102	3.814	Structure of mouse CD1d in complex with C8PhF	МНС-подобный белок CD1d
4f7c	107	3.847	Crystal structure of bovine CD1d with bound C12-di-sulfatide	МНС-подобный белок CD1d
1gzp	101	3.858	CD1b in complex with GM2 ganglioside	МНС-подобный белок CD1b

1a6z	109	4.041	HFE (HUMAN) HEMOCHROMATOSIS PROTEIN	МНС-подобный белок HFE
1s7q	112	4.069	Crystal structures of the murine class I major histocompatibility complex H-2Kb in complex with LCMV- derived gp33 index peptide and three of its escape variants	МНС класс I

Структуры, обладающие максимальным структурным сходством с CH1/CK доменами по метрике RMSD относятся к белкам главного комплекса гистосовместимости I-го и II-го классов (МНС), а также к их структурным аналогам: CD1 и HFE. Исходя из сравнимых значений степени структурного сходства (RMSD и количества аминокислот из идентичных вторичных структур) для замены могут быть выбраны любые из вышеперечисленных белков. Для дальнейших работ по замене CH1/CK доменов в иллюстративных целях был выбран CD1b, а именно его околосмембранные домены.

Пример 2. Выбор расположения дисульфидной связи между тяжелой и лёгкой цепью в молекуле антитела с заменой CH1/CK на околосмембранные домены МНС или МНС-подобных белков.

Молекула антитела человека изотипа IgG состоит из двух легких и двух тяжелых цепей. Каждая из двух лёгких цепей антитела связана с тяжелой цепью через SS-мостик — ковалентную связь между атомами серы в остатках цистеина. Эта связь образована (в случае изотипа IgG1) С-концевым остатком цистеина лёгкой цепи и с ближайшим к N-концу шарнирной области (т.н. хиндж-регион (hinge)) остатком цистеина тяжёлой цепи.

Околосмембранные домены МНС и МНС-подобных белков связаны только нековалентными связями и не образуют SS-мостиков между собой, поэтому замена CH1/CK доменов на околосмембранные домены МНС потенциально снижает

термостабильность молекулы антитела и выход целевого продукта при наработке. Во избежание этого в лёгкой цепи химерной молекулы антитела потребовалась точечная замена на цистеин в позиции, пригодной для образования SS-мостика с остатком цистеина, расположенного ближе к N-концу хиндж-региона.

Выбор позиции для введения остатка цистеина в околосмембранный домен МНС или МНС-подобного белка основан на структурном выравнивании белка МНС или МНС-подобного белка и молекулы полноразмерного антитела. По итогам выравнивания остаток цистеина вводится в околосмембранный домен МНС или МНС-подобного белка, расположенный на месте исходного домена CL (СК) антитела, в позицию, ближайшую к остатку цистеина хиндж-региона, который образует SS-мостик с лёгкой цепью в нативной молекуле антитела изотипа IgG1. По аналогии с легкой цепью нативного антитела введенный остаток цистеина является терминальным. Для того, чтобы расстояние между остатками цистеинов было достаточным для образования дисульфидной связи легкую цепь удлинили на две аминокислоты GS. На фиг. 2 схематично представлено расположение SS-мостика между тяжелой и легкой цепью в химерном антителе с заменой CH1-СК доменов на околосмембранные домены МНС-подобного белка CD1b.

Пример 3

Получение генетических конструкций для наработки двухвалентных биспецифических химерных антител

Для получения конструкций, кодирующих последовательности первой легкой и первой тяжелой цепей антитела, специфически связывающегося с первым антигеном, набирали ПЦР-продукты, содержащие гены переменных доменов тяжелой и легкой цепей антител, с праймерами, содержащими сайты рестрикции. Переменный домен тяжелой цепи клонировали в вектор pSXn-HChole-NR_VH1 по сайтам рестрикции SalI/XbaI. Переменный домен легкой цепи клонировали в вектор pSXn-CL-BR_VL1 по сайтам рестрикции SalI/XbaI.

Для получения конструкций, кодирующих последовательности второй легкой и второй тяжелой цепей антитела, специфически связывающегося со

вторым антигеном, были синтезированы конструкции, содержащие гены переменных доменов тяжелой и легкой цепей антител и околомембранные домены последовательности CD1 (<https://www.rcsb.org/structure/5wl1>) человека с различными модификациями или без таких модификаций.

Последовательность была синтезирована из олигонуклеотидов посредством ПЦР с праймерами содержащими сайты рестрикции. Переменный домен тяжелой цепи с первым околомембранным доменом последовательности CD1 человека с модификациями или без таких модификаций клонировали в вектор pSX-FCknob-PR по сайтам рестрикции SalI/XbaI. Переменный домен легкой цепи со вторым околомембранным доменом последовательности CD1 человека с модификациями или без таких модификаций клонировали в вектор pSX-HR по сайтам рестрикции SalI/XbaI.

Вышеуказанные четыре вектора были скомбинированы на стадии трансфекции для получения двухвалентных биспецифических химерных антител по изобретению.

Все указанные выше плазмиды нарабатывали в необходимых количествах в клетках *E. coli* и очищали при помощи набора Maxiprep Qiagen.

Пример 4. Влияние введенной дисульфидной связи на сборку полноразмерного химерного антитела.

Для проверки работоспособности введенной дисульфидной связи были наработаны модельные моноспецифические химерные антитела. Данный формат представляет собой антитело, состоящее из двух тяжелых и двух легких цепей, в которых СН1 тяжелой цепи и СК домен легкой цепи заменены на $\beta 2$ -микроглобулин и $\alpha 3$ -домен белка CD1b, соответственно.

Последовательности переменных доменов VH (SEQ ID NO: 103) и VL (SEQ ID NO: 104) взяты из антитела Progolimab (ЗАО Биокэд). В первом варианте образец не содержал дисульфидной связи между тяжелой и легкой цепью. Во втором варианте на С-конец легкой цепи был добавлен цистеин (как описано в примере 2), который, согласно расчетам, должен образовывать дисульфидную

связь с цистеином верхнего хиндж-региона, тем самым стабилизируя гетеродимер тяжелой и легкой цепи.

На фиг. 3 представлен результат SDS-гель-электрофореза наработанных образцов в нередуцирующих условиях. В качестве контроля на дорожке 3 нанесен образец Progolimab (классический IgG1). Из представленных результатов видно, что полноразмерная молекула собралась только в случае наличия дополнительной дисульфидной связи (дорожка 2), в случае же ее отсутствия наблюдается только фрагмент, соответствующий по подвижности димеру тяжелых цепей (дорожка 3).

Также был наработан химерное антитело с обратной ориентацией димеризующих блоков относительно тяжелых и легких цепей (CH1-домен тяжелой цепи и СК-домен легкой цепи заменены на $\alpha 3$ -домен белка CD1b и $\beta 2$ -микроглобулин, соответственно, см. фиг 1Б). На фиг. 3 (дорожка 4) представлен результат SDS-гель-электрофореза данного образца в нередуцирующих условиях, и как видно из представленных результатов, данная ориентация также позволяет собирать химерные антитела.

Пример 5. Проверка влияния димеризующего блока на основе МНС или МНС-подобного белка на корректность спаривания тяжелых и легких цепей.

Для доказательства того, что димеризующий блок на основе МНС или МНС-подобного белка выполняет свою функцию, а именно, препятствует некорректному спариванию легких цепей с несоответствующими тяжелыми цепями, был проведен следующий эксперимент на моноспецифических молекулах. Были наработаны 4 группы молекул:

1. Молекулы с «корректным» сочетанием VH и VL и «некорректной» парой константных доменов.
2. Молекулы с «некорректным» сочетанием VH и VL и «корректной» парой константных доменов.
3. Молекулы с «некорректным» сочетанием VH и VL и «некорректной» парой константных доменов.

4. Контрольные молекулы, представляющие собой классическое антитело формата IgG1 и химерное антитело, в котором константные домены заменены на околосмембранные домены из МНС или МНС-подобных белков (в данном случае β 2-микроглобулин и α 3-домен белка CD1b).

Под «корректным» сочетанием VH и VL подразумевается пара VH и VL, взятая из одного антитела. Под «некорректным» сочетанием VH и VL подразумеваются VH и VL, взятые из разных антител.

Под «корректной» парой константных доменов подразумевается либо пара CH1-СК либо пара взаимодействующих доменов из МНС-подобных белков (в данном случае β 2-микроглобулин и α 3-домен белка CD1b). Под «некорректной» парой константных доменов подразумеваются пары CH1-CD1b или β 2-микроглобулин-СК.

Общая схема эксперимента представлена на фиг. 4. В качестве переменных доменов VH1 и VL1 были взяты последовательности переменных доменов антитела Prolgolimab, в качестве переменных доменов VH2 и VL2 были взяты последовательности соответствующих переменных доменов антитела Ocrelizumab (Genentech).

Данные по продуктивности белков представлены в таблице 2. Из представленных результатов видно, что кандидаты, у которых в тяжелой цепи был константный домен CH1, а в легкой цепи околосмембранный домен белка CD1b продемонстрировали низкую продуктивность (антитела 01-001, 01-003, 01-008, 01-010). Это согласуется с общеизвестным фактом, что для корректного фолдинга и экспорта из эндоплазматического ретикулума (ЭПР) необходимо взаимодействие домена CH1 с доменом CL (Feige MJ, Groscurth S, Marciniowski M, Shimizu Y, Kessler H, Hendershot LM, Buchner J. An unfolded CH1 domain controls the assembly and secretion of IgG antibodies. *Mol Cell*. 2009 Jun 12;34(5):569-79. doi: 10.1016/j.molcel.2009.04.028. PMID: 19524537; PMCID: PMC2908990). Антитела 01-002 и 01-009 не проходили такой контроль качества в ЭПР и продемонстрировали продуктивность выше 200 мг/л, однако несмотря на высокие

значения продуктивности, их подвижности в электрофорезе в ПААГ не соответствовали подвижности полноразмерной молекулы (фиг. 5А, дорожки 2, 5).

Таблица 2. Продуктивность модельных моноспецифических химерных антител. VH - переменный домен тяжелой цепи антитела, VL - переменный домен легкой цепи антитела, CH1 – первый константный домен тяжелой цепи антитела, CK – константный домен легкой цепи антитела, b2M – β 2-микроглобулин, CD1b – α 3-домен белка CD1b.

Антитело	Экспериментальная группа	Тяжелая цепь (VH_CH1)	Легкая цепь (VL_CK)	Продуктивность на 9ый день, мг/л
01-001	1	Prolgolimab_CH1	Prolgolimab_CD1b	13,6
01-002	1	Prolgolimab_b2M	Prolgolimab_CK	230,83
01-003	1	Ocrelizumab_CH1	Ocrelizumab_CD1b	12,97
01-004	2	Prolgolimab_CH1	Ocrelizumab_CK	221,7
01-005	2	Prolgolimab_b2M	Ocrelizumab_CD1b	214,8
01-006	2	Ocrelizumab_CH1	Prolgolimab_CK	328,87
01-007	2	Ocrelizumab_b2M	Prolgolimab_CD1b	201,7
01-008	3	Prolgolimab_CH1	Ocrelizumab_CD1b	7,31
01-009	3	Prolgolimab_b2M	Ocrelizumab_CK	200,47
01-010	3	Ocrelizumab_CH1	Prolgolimab_CD1b	33,53
01-011	Контроль	Prolgolimab_b2M	Prolgolimab_CD1b	293,63
01-012	Контроль	Prolgolimab_CH1	Prolgolimab_CK	284,03

Результаты SDS-гель-электрофореза в нередуцирующих условиях представлены на фиг. 5. Как видно из представленных результатов, электрофоретическая подвижность антител из группы 1 (Фиг. 5А дорожки 1, 2, Фиг. 5Б дорожка 1) и группы 3 (Фиг. 5А дорожки 4,5, Фиг. 5В дорожка 1) оказалась выше, чем у полноразмерной молекулы (Фиг. 5В дорожка 2), что говорит о том, что молекулы не собрались. Для антител из группы 2, несмотря на то что последовательности VH и VL были взяты из разных антител, их электрофоретическая подвижность (Фиг. 5Б дорожки 2, 3, 4, 5 (то же, что и фиг 5А дорожка 3)) соответствует подвижности полноразмерной молекулы (Фиг. 5В

дорожка 2). Антитела из контрольной группы собрались, как и ожидалось (фиг. 5В дорожка 2, фиг. 5А дорожка 6 (то же, что и фиг. 5Б дорожка 6))

Полученные данные указывают на то, что димеризующий блок на основе околосмембранных доменов МНС или МНС-подобных белков препятствует образованию неправильных пар между тяжелой и легкой цепью, если эти цепи содержат константные домены различной природы.

Пример 6. Нарботка двухвалентных биспецифических химерных антител, содержащих МНС-подобный димеризующий блок.

Для проверки универсальности предложенного подхода как платформенного решения сборки биспецифических молекул с использованием любой пары антиген-связывающих фрагментов (далее переменные фрагменты легкой и тяжелой цепей) были выбраны три случайных пары переменных фрагментов легкой и тяжелой цепей из известных антител (см. таблицу 3.) и на основе их были наработаны 6 биспецифических химерных антител. Результаты продуктивности полученных белков представлены в таблице 3. Результаты SDS-гель-электрофореза наработанных образцов в нередуцирующих и редуцирующих условиях представлены на фиг 6. Для всех шести образцов присутствует мажорная полоса в области 150 кДа, соответствующая полноразмерной молекуле. Результаты чистоты образцов по эВЭЖХ также представлены в таблице 3.

Таблица 3. Продуктивность и чистота биспецифических химерных антител, полученных с помощью димеризующих блоков на основе доменов из околосмембранных доменов МНС подобных белков.

Образец	Первая пара переменных фрагментов легкой и тяжелой цепей в составе_Fab	Вторая пара переменных фрагментов легкой и тяжелой цепей и МНС- подобный	Продуктивность, 9 день, мг/л	Чистота по эВЭЖХ		
				Агрегаты, %	Мономер, %	Фрагменты, %

		димеризующий блок				
02-004	Prolgolimab	Ocrelizumab	188,6	14,22	72,94	12,84
02-005	Ocrelizumab	Prolgolimab	224,3	7,1	90,4	2,6
02-006	Prolgolimab	Анти-CSF1R	83,2	14,7	78,2	7,1
02-007	Анти-CSF1R	Prolgolimab	241,9	7,0	81,7	11,4
02-008	Ocrelizumab	Анти-CSF1R	141,0	9,0	87,1	3,9
02-009	Анти-CSF1R	Ocrelizumab	205,2	5,37	85,74	8,89

Пример 7 Определение аффинности полноразмерных биспецифических химерных антител на Forte Bio Octert RED 384

Чтобы удостовериться, что наработанные биспецифические химерные антитела не утратили свою антиген-связывающую способность был проведен анализ аффинности связывания на приборе Forte Bio Octert RED 384. Для антител 02-004 и 02-005 измеряли аффинность к экстраклеточному домену белка PD-1 человека (hPD1ex-H6F) и к биотинилированному пептиду [NH₂]CEPANPSEKNSPSTQYCYSIQS[CH₂CH₂]biotin, содержащему в аминокислотной последовательности фрагмент последовательности CD20 человека (далее обозначен CD20-пептид), для антител 02-006 и 02-007 измерялась аффинность к экстраклеточному домену белка PD-1 человека (hPD1ex-H6F) и к экстраклеточному домену белка CSF1R человека (hCSF1R_His), для антител 02-008 и 02-009 измерялась аффинность к экстраклеточному домену белка CSF1R человека (hCSF1R_His) и к CD20-пептиду.

В качестве антигена hCSF1R была взята последовательность 20-512 ак белка CSF1R человека с С-концевыми His и FLAG-тагами, молекулярная масса 57,4 кДа. В качестве антигена hPD-1ex-H6F была взята последовательность 21-170 ак белка PD-1 человека с С-концевыми His и FLAG-тагами, молекулярная масса 20,6 кДа (см. таблицу 6).

Генетические последовательности, кодирующие антигены, были синтезированы *de novo*, клонированы в экспрессионный вектор, наработаны в клетках CHO и очищены с помощью аффинной хроматографии, как описано общих примерах.

Эксперименты проводились с применением кинетического буферного раствора (далее в тексте 1хКБ) состава: 4,3 мМ Na_2HPO_4 ; 136,9 мМ NaCl , 1,5 мМ KH_2PO_4 ; 2,7 мМ KCl ; объемная доля добавленного Tween 20 составляла 0,1%; массовая доля добавленного БСА (бычий сывороточный альбумин) составляла 0,1%; pH 7,4. Перед измерением сенсоры ProA регенерировались раствором 50 мМ глицина и соляной кислоты с pH 1.8 (5 с в регенерирующем растворе, 5 секунд в 1хКБ, три повтора).

В случае антигенов hPD1ex-H6F и hCSF1R_His сенсоры ProA (Protein A (ProA) biosensors, ForteBio) погружались в раствор с антителами в концентрации 10 мкг/мл на 60 с для их иммобилизации. Запись базовой линии проводилась в 1хКБ в течение 60 с. Затем сенсоры с загруженным антителом погружались в лунки с раствором целевого антигена (аналит) в кинетическом буфере на 90 с. Измерения проводились для растворов с концентрациями аналита hPD1ex-H6F 2,50 мкг/мл (121,4 нМ), 1,25 мкг/мл (60,7 нМ), 0,625 мкг/мл (30,35 нМ). Измерения проводились для растворов с концентрациями аналита hCSF1R_His 2,50 мкг/мл (43,6 нМ), 1,25 мкг/мл (21,8 нМ), 0,625 мкг/мл (10,9 нМ). Затем детектировалась диссоциация комплекса в 1хКБ в течение 210 с для hPD1ex-H6F, 300 с для hCSF1R_His.

Референсные сенсоры проходили все этапы аналогично сенсорам, применяемым для записи сенсограмм аналита, за исключением этапа ассоциации - на этапе ассоциации данные сенсоры погружались в 1хКБ раствор без аналита (измерение сигнала референсных сенсоров осуществлялось параллельно с записью основных сенсограмм). Референсный сигнал вычитался из сигнала, полученного на сенсорах, взаимодействующих с аналитом при обработке сенсограмм.

Для проверки неспецифического взаимодействия аналита с сенсорами применялся сенсор, не загруженный антителом (на этапе загрузки сенсор погружался в 1хКБ раствор, все остальные этапы аналогичны загруженному антителом сенсору).

В случае биотинилированного CD20-пептида данный пептид в концентрации 5 мкг/мл иммобилизовали на поверхности сенсоров SAX (High Precision

Streptavidin (SAX) biosensors, ForteBio) в течение 120 с. Запись базовой линии проводилась в 1хКБ растворе в течение 120 с. Затем сенсоры с загруженным пептидом погружались в лунки с раствором антитела (аналит) в 1хКБ на 15 с. Измерения проводились для растворов с концентрациями аналита (антитела в случае CD20-пептида) 150 мкг/мл, 75 мкг/мл, 37,5 мкг/мл. Запись диссоциации комплекса проводилась в 1хКБ в течение 120 с.

Все измерения проводились при 30 °С, скорость орбитального перемешивания составляла 1000 оборотов в минуту.

Для получения численных значений кинетических констант (k_{on} - константа скорости ассоциации, k_{dis} - константа скорости диссоциации, KD - равновесная константа диссоциации или константа аффинности) полученные сенсограммы обрабатывались по модели взаимодействия 1:1 («один к одному») при помощи метода Global Fit (подбор одного набора констант k_{on} , k_{dis} , KD для анализа нескольких сенсограмм разных концентраций) программного обеспечения ForteBio Octet Data Analysis 9.0. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4. Кинетические константы k_{on} , k_{dis} , KD взаимодействия антител 02-004 – 02-009 с целевыми антигенами.

Антитело	Антиген	KD (M)	k_{on} (M ⁻¹ c ⁻¹)	k_{dis} (c ⁻¹)	R ²
02-004	hPD1ex-H6F	3,49E-09	2,16E+05	7,53E-04	0,9916
	CD20-пептид	1,27E-06	1,88E+05	2,38E-01	0,9781
02-005	hPD1ex-H6F	5,69E-09	1,78E+05	1,01E-03	0,9894
	CD20-пептид	1,12E-06	3,05E+05	3,42E-01	0,9789
02-006	hPD1ex-H6F	2,51E-09	2,75E+05	6,91E-04	0,9867
	hCSF1R_His	7,97E-10	3,59E+05	2,86E-04	0,9985
02-007	hPD1ex-H6F	4,49E-09	2,42E+05	1,09E-03	0,9873
	hCSF1R_His	8,31E-10	3,78E+05	3,14E-04	0,9986
02-008	CD20-пептид	8,92E-07	3,69E+05	3,29E-01	0,9696
	hCSF1R_His	5,49E-10	4,29E+05	2,36E-04	0,9982
02-009	hCSF1R_His	4,20E-10	5,00E+05	2,10E-04	0,9984
	CD20-пептид	8,20E-07	2,16E+05	1,77E-01	0,9780

Результаты проверки неспецифического взаимодействия анализатора с незагруженными сенсорами представлены в таблице 5. Не выявлено неспецифического взаимодействия анализатора с незагруженными сенсорами.

Таблица 5. Результаты проверки неспецифического взаимодействия анализатора с незагруженными сенсорами

Тип сенсоров	Аналит	Концентрация, мкг/мл	Сигнал, нм
ProA	hPD1ex-H6F	2,5	-0,023
ProA	hCSF1R_His	2,5	-0,0038
SAX	02-004	150	0,017
SAX	02-005	150	0,0048
SAX	02-008	150	0,0173
SAX	02-009	150	0,0112

Из представленных результатов следует, что все биспецифические химерные антитела 02-004 - 02-009 демонстрируют специфичное связывание с целевыми антигенами, причем в независимости от положения соответствующих антиген-связывающих фрагментов (в составе Fab-фрагмента или в составе Fab-подобного фрагмента, содержащего β 2-микроглобулин и α 3-домен белка CD1b вместо СК- и СН1-доменов) численные значения KD имеют один и тот же порядок величины.

Пример 8. Анализ неспецифического связывания биспецифических химерных антител с нецелевыми антигенами

Эксперименты по исследованию неспецифического связывания биспецифических химерных антител с нецелевыми антигенами проводились на приборе Forte Bio Octert RED 384.

Сенсоры ProA (Protein A (ProA) biosensors, ForteBio) погружали в раствор с антителами в концентрации 10 мкг/мл на 150 секунд для их иммобилизации. Запись базовой линии проводилась в 1хКБ растворе в течение 30 с. Затем сенсоры с загруженным антителом погружали в лунки с растворами нецелевых антигенов в

концентрации 30 мкг/мл на 150 с. Затем записывалась диссоциацию комплекса в течение 30 секунд.

Референсные сенсоры проходили все этапы аналогично сенсорам, применяемым для записи сенсограмм аналита, за исключением этапа ассоциации - на этапе ассоциации данные сенсоры погружались в кинетический буферный раствор без аналита (измерение сигнала референсных сенсоров осуществлялось параллельно с записью основных сенсограмм). Референсный сигнал вычитался из сигнала, полученного на сенсорах, взаимодействующих с аналитом при обработке сенсограмм.

В панель антигенов входили: hAng2_H6F, hPD1ex-H6F, hCSF1R_His, IL5R-His, hIL4R-His, hCD38-Avi, C-Avi-His-TEVs-HSA_hBCMA, Her3-H6F, hisOX40, Масаса CSF1R_C-His (см. таблицу 6) Для каждого исследуемого антитела в данной панели антигенов есть специфичный (целевой) антиген, результаты взаимодействия с целевым антигеном приведены в качестве положительного контроля.

Обработка сенсограмм проводилась с применением программного обеспечения ForteBio Octet Data Analysis 9.0. Для заключения об отсутствии неспецифического взаимодействия проверялся регистрируемый уровень сигнала в конце этапа ассоциации (параметр response). Результаты проверки связывания биспецифических химерных антител представлены в таблице 7. В результате эксперимента не выявлено взаимодействия антител 02-004 - 02-009 с нецелевыми антигенами.

Таблица 6. Состав антигенов

Антиген	Название белка	UNIPROT ID	Аминокислоты
PD1ex-H6F	Programmed cell death protein 1 (Homo sapiens)	Q15116	21-170
hCD38-Avi	ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase 1 (Homo sapiens)	P28907	43-300
Her3-H6F	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-3 (Homo sapiens)	P21860	21-643
IL4R-His	Interleukin-4 receptor subunit alpha (Homo sapiens)	P24394	27-227

hAng-H6F	Angiopoietin-2 (Homo sapiens)	O15123	19-496
His-OX40	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 4 (Homo sapiens)	P43489	26-210
IL5R-His	Interleukin-5 receptor subunit alpha (Homo sapiens)	Q01344	22-342
hCSF1R_His	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor (Homo sapiens)	P07333	20-512
Macaca CSF1R_C-His	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor (Macaca mulatta)	F7BTH9	20-513
C-Avi-His-TEVs-HSA_hBCMA	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 17 (Homo sapiens)	Q02223	1-54

Таблица 7. Результаты проверки неспецифического связывания биспецифических химерных антител по изобретению. Для каждого исследуемого образца в данной панели антигенов есть один или несколько специфичных (целевых) антигенов, результаты взаимодействия с целевым антигеном приведены в качестве положительного контроля.

Антитело	Аналит (антиген из панели)	Концентрация (нМ)	Уровень сигнала (нМ)	Комментарии
02-004	hAng_H6F	510,2	0,0212	
	hPD1ex-H6F	1456	0,3503	Специфичный антиген
	hCSF1R_His	522,5	0,0103	
	IL5R-His	757,6	0,0249	
	hIL4R-His	1154	0,0102	
	hCD38-Avi	854,7	0,004	
	C-Avi-His-TEVs-HSA_hBCMA	391,2	0,0108	
	Her3-H6F	420,8	0,0217	
	hisOX40	1310	0,0103	
	Macaca CSF1R_C-His	534,8	0,0236	
02-005	hAng_H6F	510,2	-0,0194	
	hPD1ex-H6F	1456	0,1386	Специфичный антиген

	hCSF1R_His	522,5	0,0034	
	IL5R-His	757,6	0,0225	
	hIL4R-His	1154	-0,0057	
	hCD38-Avi	854,7	0,0072	
	C-Avi-His-TEVs-HSA_hBCMA	391,2	0,0021	
	Her3-H6F	420,8	-0,0128	
	hisOX40	1310	-0,0169	
	Macaca CSF1R_C-His	534,8	-0,0084	
02-006	hAng_H6F	510,2	-0,0239	
	hPD1ex-H6F	1456	0,1443	Специфичный антиген
	hCSF1R_His	522,5	0,573	Специфичный антиген
	IL5R-His	757,6	0,0153	
	hIL4R-His	1154	-0,0075	
	hCD38-Avi	854,7	0,0158	
	C-Avi-His-TEVs-HSA_hBCMA	391,2	0,0009	
	Her3-H6F	420,8	-0,0115	
	hisOX40	1310	-0,0094	
	Macaca CSF1R_C-His	534,8	0,5868	Специфичный антиген
02-007	hAng_H6F	510,2	-0,0079	
	hPD1ex-H6F	1456	0,1716	Специфичный антиген
	hCSF1R_His	522,5	0,5375	Специфичный антиген
	IL5R-His	757,6	0,0221	
	hIL4R-His	1154	0,0051	
	hCD38-Avi	854,7	0,0088	
	C-Avi-His-TEVs-HSA_hBCMA	391,2	0,0061	
	Her3-H6F	420,8	-0,0063	
	hisOX40	1310	-0,0056	

	Macaca CSF1R_C-His	534,8	0,5347	Специфичный антиген
02-008	hAng_H6F	510,2	-0,0124	
	hPD1ex-H6F	1456	-0,0033	
	hCSF1R_His	522,5	0,5477	Специфичный антиген
	IL5R-His	757,6	0,0098	
	hIL4R-His	1154	-0,002	
	hCD38-Avi	854,7	0,0028	
	C-Avi-His-TEVs-HSA_hBCMA	391,2	-0,0023	
	Her3-H6F	420,8	-0,0108	
	hisOX40	1310	-0,012	
	Macaca CSF1R_C-His	534,8	0,549	Специфичный антиген
02-009	hAng_H6F	510,2	-0,0114	
	hPD1ex-H6F	1456	-0,0059	
	hCSF1R_His	522,5	0,5641	Специфичный антиген
	IL5R-His	757,6	-0,0064	
	hIL4R-His	1154	-0,0036	
	hCD38-Avi	854,7	-0,0089	
	C-Avi-His-TEVs-HSA_hBCMA	391,2	-0,0154	
	Her3-H6F	420,8	-0,0161	
	hisOX40	1310	-0,0158	
	Macaca CSF1R_C-His	534,8	0,5307	Специфичный антиген
Отрицательный контроль	hAng_H6F	510,2	0,0076	Проверка сигнала взаимодействия не загруженных антителами сенсоров с антигенами
	hPD1ex-H6F	1456	-0,0037	
	hCSF1R_His	522,5	0,0102	
	IL5R-His	757,6	0,0558	
	hIL4R-His	1154	0,0105	
	hCD38-Avi	854,7	0,002	
	C-Avi-His-TEVs-HSA_hBCMA	391,2	-0,008	
	Her3-H6F	420,8	-0,0146	

	hisOX40	1310	-0,0087	
	Macaca CSF1R_C-His	534,8	0,0024	

Пример 9 Анализ одновременного связывания биспецифических химерных антител по изобретению с двумя антигенами.

Для антител 02-006 и 02-007 был проведен анализ одновременного связывания с двумя различными целевыми антигенами (hPD1ex-H6F и hCSF1R_His) на приборе Forte Bio Octet RED 384. Эксперимент проводился на сенсорах AR2G (Amine Reactive Second-Generation (AR2G) biosensors, ForteBio). Этапы эксперимента представлены в таблице 8.

Таблица 8. Этапы эксперимента по проверке одновременного связывания биспецифических химерных антител по изобретению с двумя различными антигенами

№	Этап эксперимента	Длительность этапа (с)	Комментарии
1	Базовая линия	60	Вспомогательный этап, уравнивание в воде, проверка записываемого сигнала на сенсорах
2	Активация	300	Водный раствор активаторов 20 mM EDC (1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимид гидрохлорид) и 10 mM sNHS (N-гидроксисульфосукцинимид)
3	Загрузка	900	Загрузка белка hPD1ex-H6F (15 мкг/мл) в 10 mM натрий ацетатном буферном растворе pH 5,0
4	Тушение	300	1 М этаноламин pH 8,5. Тушение непрореагировавших активных групп на поверхности сенсора
5	Базовая линия 2	300	Уравнивание сенсоров в кинетическом буферном растворе
6	Загрузка 2	300	Загрузка антитела на сенсоры обусловлена взаимодействием с иммобилизованным на сенсорах hPD1ex-H6F
7	Базовая линия 3	15	Уравнивание сенсоров в кинетическом буферном растворе, проверка скорости диссоциации антитела с сенсоров

8	Ассоциация	60	Взаимодействие с hCSF1R_His
9	Диссоциация	30	Вспомогательный этап, подтверждает отсутствие быстрой диссоциации после связывания с hCSF1R_His

Активация сенсоров осуществлялась в водном растворе, содержащем 20 мМ EDC (1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимид гидрохлорид) и 10 мМ sNHS (*N*-гидроксисульфосукцинимид) в течении 300 с. Загрузка антигена (hPD1ex-H6F) на поверхность биосенсоров осуществлялась в 10 мМ натрий-ацетатном буфере с pH 5,0 в течении 300 с. Концентрация белка для загрузки составляла 15 мкг/мл. Тушение непрореагировавших активных центров на поверхности сенсоров осуществлялось в 1М водном растворе этаноламина с pH 8,5 в течение 300 с. Базовая линия на пятом этапе эксперимента и все последующие шаги проводились в кинетическом буферном растворе (1хКБ) состава: 4,3 мМ Na₂HPO₄; 136,9 мМ NaCl, 1,5 мМ KH₂PO₄; 2,7 мМ KCl; объемная доля добавленного Tween 20 составляла 0,1%; массовая доля добавленного БСА составляла 0,1%; pH 7,4. После записи базовой линии (этап 5) проходила загрузка антител на сенсоры, концентрация загружаемого антитела 30 мкг/мл (этап 6). Далее проводилась запись третьей базовой линии (этап 7). Данный этап демонстрирует отсутствие быстрого спада сигнала, что указывает на специфичное взаимодействие загруженного антител с hPD1ex-H6F иммобилизированным ранее на сенсоры. На следующем этапе ассоциации (этап 8) сенсоры с иммобилизированным hPD1ex-H6F и связавшимися антителами погружаются в раствор антигена hCSF1R_His с концентрацией 100 мкг/мл. Рост сигнала на данном этапе обусловлен наличием у антител, загруженных на сенсоры, FAB фрагмента к антигену hCSF1R_His.

Анализа сенсограмм проводился с применением программного обеспечения ForteBio Octet Data Analysis 9.0. Основные выводы представлены в таблице 9. Сенсограммы шагов (этапов) эксперимента представлены на фиг.7. Из представленных результатов следует, что образцы 02-006 и 02-007 демонстрируют одновременное связывание с антигенами hPD1ex-H6F и hCSF1R_His.

Таблица 9. Результаты эксперимента по одновременному взаимодействию антител 02-006 и 02-007 с двумя различными антигенами (hPD1ex-H6F и hCSF1R_His).

Исследуемое антитело	Загруженные на сенсор белки	Ассоциация	Уровень сигнала (нм)	Комментарии
02-006	Иммобилизованный hPD1ex-H6F с загруженным антителом 02-006	hCSF1R_His (100 мкг/мл)	0,1375	Демонстрирует одновременное взаимодействие с двумя различными антигенами (hPD1ex-H6F и hCSF1R_His)
		1xКБ	-0,0194	
02-007	Иммобилизованный hPD1ex-H6F с загруженным антителом 02-007	hCSF1R_His (100 мкг/мл)	0,0757	Демонстрирует одновременное взаимодействие с двумя различными антигенами (hPD1ex-H6F и hCSF1R_His)
		1xКБ	-0,0125	
Проверка неспецифического взаимодействия аналита (hCSF1R_His) с сенсорами, загруженными hPD1ex-H6F	Иммобилизованный hPD1ex-H6F, антитело не загружено	hCSF1R_His (100 мкг/мл)	-0,0023	Данный контроль демонстрирует, что сенсоры с иммобилизованным hPD1ex-H6F не взаимодействуют с hCSF1R_His без загрузки антител

Из представленных результатов видно, что антитела 02-006 и 02-007 демонстрируют одновременное связывание с антигенами hPD1ex-H6F и hCSF1R_His.

Пример 10. Анализ молекулярной массы биспецифических химерных антител по изобретению с помощью обращенно-фазовой ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ УВЭЖХ) с масс-спектрометрическим детектированием

Для подтверждения правильности сборки молекул был проведен анализ молекулярных масс полноразмерных биспецифических химерных антител по изобретению. Данный метод позволяет выявить полноразмерные биспецифические химерные антитела по изобретению, состоящие из 4х различных цепей и отличить их от побочных продуктов, образованных из другого набора цепей. Эти данные в совокупности с данными, полученными в примере 5, говорят о том, что технологическое решение, основанное на замене пары константных доменов CH1-СК на пару околосмембранных доменов из МНС или МНС-подобных белков, обеспечивает правильную сборку биспецифических химерных антител по изобретению.

Анализ проводился с помощью хромато-масс-спектрометрического комплекса Agilent 1290 Infinity II UPLC –Agilent 6530 Q-ToF колонке BioResolve Polyphenyl RP (2,1x50 мм, диаметр частиц 2,7 мкм; также использовали предколонку BioResolve Polyphenyl RP 2,1x5 мм, диаметр частиц 2,7 мкм). Перед анализом все молекулы были обработаны ферментом PNGase F (Promega) для удаления N-гликанов. Для этого фермент разводили водой до концентрации 1 ед активности в мкл. Образец с содержанием белка 120 мкг смешивали с буферным раствором (100 мМ бикарбонат аммония pH 7,2), добавляли раствор PNGase F в соотношении фермент:белок – 1 ед :50 мкг, и инкубировали в термостате в течение 18 часов при $(37,0 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$.

Для анализа отбирали 10 мкг испытуемого раствора в соответствии с измеренными концентрациями белка и доводили концентрацию подвижной фазой А до 0,2 мг/мл. Объем ввода образца составлял 7 мкл.

Перед началом анализа хроматографическую систему уравнивали подвижной фазой при исходном соотношении подвижных фаз А: 95%, В: 5% (фаза А содержит 0,1% раствор муравьиной кислоты, 0,02% раствор трифторуксусной кислоты в воде, фаза В - 0,1% раствор муравьиной кислоты, 30% ацетонитрил в изопропиловом спирте) в течение не менее 30 мин до достижения стабильного давления. Проводили калибровку масс-спектрометра с помощью стандарта для калибровки в соответствии с рекомендациями производителя.

Разделение образца проводили при скорости потока 0,5 мл/мин в градиенте концентрации подвижной фазы В (с 5% до 27% с 5 до 6 мин после ввода образца, далее с 27% до 37% с 6 по 30 мин) при температуре колонки $(60 \pm 1) ^\circ\text{C}$, снимали хроматограмму при длине волны 280 нм.

Обработка данных проводилась в программном обеспечении (ПО) PMi Intact.

Названия цепей, составляющих биспецифические химерные антитела, представлены в таблице 10.

Таблица 10. Названия цепей, составляющих биспецифические химерные антитела 02-004 – 02-009

Антитело	Название цепей, составляющих антитело-подобный белок
02-004	Prolgolimab_VH_HC_hole
	Prolgolimab_VL_CK
	Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob
	Ocrelizumab_VL_CD1b
02-005	Ocrelizumab_VH_HC_hole
	Ocrelizumab_VL_CK
	Prolgolimab_VH_b2m_Fc_knob
	Prolgolimab_VL_CD1b
02-006	Prolgolimab_VH_HC_hole
	Prolgolimab_VL_CK
	Анти-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob
	Анти-CSF1R_VL_CD1b
02-007	Анти-CSF1R_VH_HC_hole
	Анти-CSF1R_VL_CK
	Prolgolimab_VH_b2m_Fc_knob
	Prolgolimab_VL_CD1b
02-008	Ocrelizumab_VH_HC_hole
	Ocrelizumab_VL_CK
	Анти-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob
	Анти-CSF1R_VL_CD1b
02-009	Анти-CSF1R_VH_HC_hole
	Анти-CSF1R_VL_CK
	Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob
	Ocrelizumab_VL_CD1b

Результаты анализа масс для антител 02-004, 02-006, 02-009 (как наиболее репрезентативные) представлены в таблице 11. Также на фиг. 8 представлены изображения деконволюированного масс-спектра пиков 4-6 хроматограммы полного ионного тока для антитела 02-004, для остальных антител пики выглядели сходным образом.

Для каждого антитела в таблице представлена масса вещества в соответствующих пиках хроматограммы, также проведена аннотация пиков, в результате чего были идентифицированы цепи, из которых состоят фрагменты определенной массы. Для всех образцов наблюдалось схожее распределение масс: основной пик в районе 146 кДа, а также минорные пики масс порядка 23 кДа (соответствует массе одиночной легкой цепи) и масс порядка 74 кДа (соответствуют гетеродимеру тяжелой и легкой цепи). Основные пики были проаннотированы, исходя из теоретических значений средних масс.

Пик 4 антитела 02-004 не был проаннотирован ПО, так как настройки включали допущение, что все N-концевые глутамины находятся в пирроформе (соответственно, масса пироглутамин на 18 Да меньше массы глутамин). Таким образом массы, полученные в пике 4 соответствуют массам молекул, аннотированных в пике 5, в которых один из N-концевых глутаминов находится в непирроформе.

Пики 5 и 6 антитела 02-004 несут в себе по 3 массы, соответствующие полноразмерной молекуле и двум безлизиновым формам полноразмерной молекулы (с одним отсутствующим C-концевым цистеином и с двумя отсутствующими C-концевыми лизинами). Для антител 02-006 и 02-009 характерно аналогичное распределение масс.

Таблица 11. Аннотация пиков хроматограммы полного ионного тока. Соответствие антител и названий цепей представлена в таблице 10. «-Lys(1)» - отсутствует один из C-концевых лизинов тяжелых цепей, «-Lys(2)» - отсутствуют оба C-концевых лизина тяжелых цепей.

Антител о	Пик , №	Время выхода , мин.	Относительна я интенсивност ь массы в пике, %	Аннотирование пика (цепи, составляющие молекулу)	Масса, Да	Относительна я площадь пика, %
02-004	1	8,12793	100	23263	23262, 5	0,452
	2	9,00068	34,9407	23432	23431, 6	1,061
			100	23245	23245, 1	
	3	14,1315	89,472	74260	74259, 7	12,933
			91,3607	Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_kno b, Ocrelizumab_VL_CD1b	73961, 5	
			95,6128	74138	74138, 2	
			100	74088	74088, 5	
	4	17,711	37,5684	146957	146957	26,771
			69,086	146828	146828	
			100	146701	146701	
	5	18,0457	39,3818	Ocrelizumab_VL_CD1b, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_kno b, Prolgolimab_VH_HC_hole, Prolgolimab_VL_CK	146936	55,956
			69,116	Ocrelizumab_VL_CD1b, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_kno b, Prolgolimab_VH_HC_hole- Lys(1), Prolgolimab_VL_CK	146812	
			100	Ocrelizumab_VL_CD1b, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_kno b, Prolgolimab_VH_HC_hole- Lys(2), Prolgolimab_VL_CK	146684	
	6	19,5708	48,9742	Ocrelizumab_VL_CD1b, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_kno	146935	2,828

02-006				b, Prolgolimab_VH_HC_hole, Prolgolimab_VL_CK		
			78,6579	Ocrelizumab_VL_CD1b, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_kno b, Prolgolimab_VH_HC_hole- Lys(1), Prolgolimab_VL_CK	146826	
			100	Ocrelizumab_VL_CD1b, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_kno b, Prolgolimab_VH_HC_hole- Lys(2), Prolgolimab_VL_CK	146696	
	1	8,9566	42,2628	23432	23431, 9	0,757
			100	23245	23245, 5	
	2	15,5067	76,2204	Анти-CSF1R_VL_CD1b, Анти- CSF1R_VH_b2m_Fc_knob	73805, 3	9,69
			96,3739	74117	74117, 2	
			98,217	73931	73931, 2	
			100	73986	73985, 7	
	3	18,7862	47,5686	Анти- CSF1R_VH_b2m_Fc_knob, Анти-CSF1R_VL_CD1b, Prolgolimab_VH_HC_hole, Prolgolimab_VL_CK,	146786	89,553
			76,1565	Анти- CSF1R_VH_b2m_Fc_knob, Анти-CSF1R_VL_CD1b, Prolgolimab_VH_HC_hole- Lys(1), Prolgolimab_VL_CK	146661	
			100	Анти- CSF1R_VH_b2m_Fc_knob, Анти-CSF1R_VL_CD1b, Prolgolimab_VH_HC_hole- Lys(2), Prolgolimab_VL_CK	146534	

02-009	1	8,08387	45,7919	Анти-CSF1R_VL_CK, Reference	23035, 6	2,969
			78,2384	23341	23341	
			100	23155	23154, 7	
	2	14,1756	60,3569	Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_kno b, Ocrelizumab_VL_CD1b(1)	73962, 3	14,71
			69,7348	74091	74091	
			97,9381	74134	74134, 2	
			100	74259	74259, 5	
	3	17,2699	32,2696	Анти-CSF1R_VH_HC_hole, Анти-CSF1R_VL_CK, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_kno b, Ocrelizumab_VL_CD1b	146524	74,95
			63,7103	Анти-CSF1R_VH_HC_hole, Анти-CSF1R_VL_CK, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_kno b-Lys(1), Ocrelizumab_VL_CD1b	146399	
			100	Анти-CSF1R_VH_HC_hole, Анти-CSF1R_VL_CK, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_kno b-Lys(2), Ocrelizumab_VL_CD1b	146271	
	4	18,892	39,1159	Анти-CSF1R_VH_HC_hole, Анти-CSF1R_VL_CK, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_kno b, Ocrelizumab_VL_CD1b	146526	7,371
			69,8928	Анти-CSF1R_VH_HC_hole, Анти-CSF1R_VL_CK, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_kno b-Lys(1), Ocrelizumab_VL_CD1b	146404	
			100	Анти-CSF1R_VH_HC_hole, Анти-CSF1R_VL_CK,	146275	

				Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_kno b-Lys(2), Ocrelizumab_VL_CD1b		
--	--	--	--	---	--	--

Суммируя все вышесказанное, результаты демонстрируют, что масса полноразмерных биспецифических химерных антител соответствует массе молекулы, состоящей из четырех различных цепей. Также в препаратах присутствуют низкомолекулярные фрагменты, но в минорном количестве.

Пример 11. Подтверждение правильности сборки биспецифических химерных антител по изобретению с помощью протеолиза и анализа масс полученных фрагментов

Для прямой проверки корректного спаривания легких и тяжелых цепей проводили расщепление биспецифических химерных антител по изобретению протеазой GingisKHAN (Genovis), сайт узнавания которой находится в хиндж-регионе антитела (...KSCDK/THTCPPCP...). После такого протеолиза полноразмерное антитело распадается на Fc-фрагмент, Fab-фрагмент и Fab-подобный фрагмент, содержащий $\beta 2$ -микроглобулин и $\alpha 3$ -домен белка CD1b вместо СК- и СН1-доменов. Фрагменты биспецифической молекулы после протеолиза анализировали при помощи вертикального электрофореза в нередуцирующих условиях, а также проводили масс-спектрометрический анализ полученных фрагментов.

Реакционная смесь для протеолиза содержала 40 мкг биспецифического антитела и 40 единиц фермента GingisKHAN (соотношение 1 единица фермента на 1 мкг белка) в буфере состава 100 мМ Трис-HCl, pH 8,0, 1 мМ цистеин в объеме 60 мкл. Реакцию проводили в термостате при $(37,0 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$ в течение 1 ч и останавливали добавлением йодацетамида до концентрации 10 мМ. Для проведения электрофореза к полученным образцам добавляли буфер, содержащий SDS (до концентрации 1% SDS), и проводили SDS-гель-электрофорез в нередуцирующих условиях.

Результаты SDS-гель-электрофореза представлены на фиг. 9. После обработки биспецифических химерных антител (02-004 – 02-009) протеазой GingisKHAN образуется 3 мажорных фрагмента, наблюдаемых на электрофореграмме в области 40-50 кДа и обладающих разной подвижностью в ПААГ. Моноспецифические молекулы, содержащие (01-011) и не содержащие димеризующий блок на основе околосмембранных доменов МНС-подобного белка CD1b (Prolgolimab, Ocrelizumab), были также обработаны протеазой GingisKHAN (фиг. 9Б, дорожки 3, 4, 5). В результате сопоставления электрофоретических подвижностей, образующихся в результате протеолиза фрагментов, был сделан вывод, что фрагмент с наименьшей подвижностью соответствует Fc-фрагменту, со средней подвижностью – Fab-фрагменту, а фрагмент с наивысшей подвижностью – Fab-подобному фрагменту, содержащему $\beta 2$ -микроглобулин и $\alpha 3$ -домен белка CD1b вместо СК- и СН1-доменов. В случае антител 02-006 – 02-009 на электрофореграмме наблюдался дополнительный фрагмент, образующийся в результате неспецифического разрезания варибельного домена анти-CSF1R фрагмента. Чтобы установить точные массы образующихся в результате протеолиза фрагментов был проведен масс-спектрометрический анализ.

Перед масс-спектрометрическим анализом образцы сразу после добавления йодоацетамида переводили в 50 мМ бикарбонат аммония, pH ($7,6 \pm 0,2$), на колонках Zeba (MWCO 7 kDa), согласно рекомендациям производителя, после чего к образцам добавляли PNGase F в соотношении 1 ед. фермента на 50 мкг белка и инкубировали в термостате в течение 18 часов при ($37,0 \pm 0,1$) °C.

Анализ масс полученных фрагментов проводился по методике, описанной в примере 10.

Результаты ОФ УВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием представлены в таблице 12.

Для антител 02-006 и 02-008 наблюдались фрагменты массой 11424 Да и 37035 Да, которые в сумме дают 48459 Да, что соответствует массе Fab-подобному фрагменту, содержащему $\beta 2$ -микроглобулин и $\alpha 3$ -домен белка CD1b вместо СК- и СН1-доменов и варибельным фрагментам легкой и тяжелой цепей к CSF1R. Для

антител 02-007 и 02-009 наблюдались фрагменты массой 11424 Да и 36062 Да, которые в сумме дают 47486 Да, что соответствует массе Fab фрагмента с переменными фрагментами легкой и тяжелой цепей к CSF1R, что согласуется с данными, полученными после SDS-гель-электрофореза данных образцов и подтверждает предположение о дополнительном сайте протеолиза в переменном домене к CSF1R (фиг.9).

Таблица 12. Аннотация пиков хроматограммы полного ионного тока. Соответствие образцов и названий цепей представлена в таблице 10. Npart – N-концевой участок соответствующей цепи, образующийся после разрезания полноразмерного антитела протеазой GingisKHAN, Cpart – C-концевой участок соответствующей цепи, образующийся после разрезания полноразмерного биспецифического химерного антитела протеазой GingisKHAN.

Антитело	Пик, №	Время выхода, мин	Доля массы в пике	Аннотирование пика	Масса, Да	Относительная площадь пика, УФ 280нм %
02-004 GingisKHAN	1	7,72 388	1,0 0	Prolgolimab_VH_HC_hole-Cpart, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Cpart (Fc-фрагмент)	5024 2,5	16,48
	2	13,1 124	0,0 4	37128	3712 8,3	2,47
			0,1 0	47583	4758 3,1	
			0,1 3	36023	3602 2,6	
			0,7 4	Ocrelizumab_VL_CD1b, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Npart (Fab-подобный фрагмент, содержащий β 2-микроглобулин и α 3-домен белка CD1b вместо СК- и CH1-доменов (далее Fab-подобный фрагмент))	4861 6,5	

	3	13,3 272	1,0 0	Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Npart, Ocrelizumab_VL_CD1b (Fab-подобный фрагмент)	4859 9,5	3,44
	4	13,5 261	1,0 0	Ocrelizumab_VL_CD1b, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Npart (Fab-подобный фрагмент)	4861 5	9,04
	5	13,8 08	1,0 0	Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Npart, Ocrelizumab_VL_CD1b (Fab-подобный фрагмент)	4859 8,5	36,41
	6	14,2 39	1,0 0	Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Npart, Ocrelizumab_VL_CD1b (Fab-подобный фрагмент)	4847 0,4	7,95
	7	16,2 781	0,2 2	47918.1 (непироформа Fab фрагмента)	4791 8,1	1,71
			0,7 8	Ocrelizumab_VL_CD1b, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Npart (Fab-подобный фрагмент)	4860 0,4	
	8	17,2 727	1,0 0	Prolgolimab_VH_HC_hole-Npart, Prolgolimab_VL_CK (Fab-фрагмент)	4790 0,5	8,55
	9	17,5 877	1,0 0	Prolgolimab_VH_HC_hole-Npart, Prolgolimab_VL_CK (Fab-фрагмент)	4788 3,1	12,6
	10	18,4 497	1,0 0	47865	4786 5,5	1,36
02-005 GingisK HAN	1	7,72 805	1,0 0	Ocrelizumab_VH_HC_hole_C-part, Prolgolimab_VH_b2m_Fc_knob_C-part (Fc-фрагмент)	5024 2,5	15,24
	2	13,0 666	1,0 0	Ocrelizumab_VH_HC_hole_N-part, Ocrelizumab_VL_CK (Fab-фрагмент)	4762 5,9	4,52
	3	13,6 131	1,0 0	Ocrelizumab_VH_HC_hole_N-part, Ocrelizumab_VL_CK (Fab-фрагмент)	4762 5	32,12
	4	14,6 078	0,4 6	Ocrelizumab_VH_HC_hole_N-part, Ocrelizumab_VL_CK (Fab-фрагмент)	4762 5,4	5,98
			0,5 4	47607	4760 6,8	

02-006 GingisK HAN	5	16,0 17	0,1 2	Ocrelizumab_VH_HC_hole_N-part, Ocrelizumab_VL_CK (Fab-фрагмент)	4762 5,5	9,65
			0,8 8	48874	4887 4,2	
	6	16,4 977	0,1 0	Ocrelizumab_VH_HC_hole_N-part, Ocrelizumab_VL_CK (Fab-фрагмент)	4874 6,5	27,74
			0,9 0	Prolgolimab_VL_CD1b, Prolgolimab_VH_b2m_Fc_knob_N-part (Fab-подобный фрагмент)	4885 6,7	
	7	16,9 122	0,4 6	Prolgolimab_VL_CD1b, Prolgolimab_VH_b2m_Fc_knob_N-part (Fab-подобный фрагмент)	4872 8,5	4,75
			0,5 4	Ocrelizumab_VH_HC_hole_N-part, Ocrelizumab_VL_CK (Fab-фрагмент)	4762 6,4	
	1	7,67 755	1,0 0	Prolgolimab_VH_HC_hole_C-part, Анти- CSF1R_VH_b2m_Fc_knob_C-part (Fc-фрагмент)	5024 2,5	15,11
02-006 GingisK HAN	2	7,92 622	0,1 3	Prolgolimab_VH_HC_hole_C-part, Анти- CSF1R_VH_b2m_Fc_knob_C-part (Fc-фрагмент)	5024 2,5	7,1
			0,8 7	11424	1142 4,5	
	3	11,5 402	1,0 0	37035	3703 5	4,02
	4	15,2 867	1,0 0	48459	4845 8,9	5,16
	5	15,4 857	1,0 0	Анти-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob_N-part, Анти- CSF1R_VL_CD1b (Fab-подобный фрагмент)	4844 2,1	24,04
	6	17,0 937	1,0 0	Prolgolimab_VH_HC_hole_N-part, Prolgolimab_VL_CK (Fab-фрагмент)	4790 0,5	10,97
	7	17,5 579	1,0 0	Prolgolimab_VH_HC_hole_N-part, Prolgolimab_VL_CK (Fab-фрагмент)	4788 3	27,76

	8	18,4 697	1,0 0	47865,2	4786 5,2	5,84
02-007 GingisK HAN	1	7,70 328	1,0 0	Анти-CSF1R_VH_HC_hole_C-part, Prolgolimab_VH_b2m_Fc_knob_C-part (Fc-фрагмент)	5024 2	9,48
	2	7,93 537	1,0 0	11425	1142 4,5	6,03
	3	11,0 188	1,0 0	36062	3606 1,5	3,63
	4	15,6 825	0,3 8	47486	4748 5,9	6,14
			0,6 2	48891	4889 0,5	
	5	16,1 911	0,2 7	48873,9	4887 3,9	33,27
			0,7 3	Анти-CSF1R_VH_HC_hole_N-part, Анти-CSF1R_VL_CK (Fab-фрагмент)	4746 8,6	
	6	16,5 06	0,1 0	Анти-CSF1R_VH_HC_hole_N-part, Анти-CSF1R_VL_CK (Fab-фрагмент)	4746 9,1	27,71
			0,9 0	Prolgolimab_VL_CD1b, Prolgolimab_VH_b2m_Fc_knob_N-part (Fab-подобный фрагмент)	4885 6,5	
	7	16,9 205	0,1 2	47595,5	4759 5,5	13,74
			0,3 8	Prolgolimab_VL_CD1b, Prolgolimab_VH_b2m_Fc_knob_N-par (Fab-подобный фрагмент)	4885 7,2	
			0,5 0	47451	4745 0,7	
02-008 GingisK HAN	1	7,66 267	1,0 0	Ocrelizumab_VH_HC_hole_C-part, Анти-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob_C-part (Fc-фрагмент)	5024 2,1	20,18
	2	7,92 792	0,3 2	Ocrelizumab_VH_HC_hole_C-part Анти-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob_C-part (Fc-фрагмент)	5024 2,6	4,85

			0,6 8	11425	1142 4,5	
	3	11,6 082	1,0 0	37035	3703 5	1,25
	4	13,1 002	1,0 0	Ocrelizumab_VH_HC_hole_N-part, Ocrelizumab_VL_CK (Fab-фрагмент)	4762 6	5,25
	5	13,6 472	1,0 0	Ocrelizumab_VH_HC_hole_N-part, Ocrelizumab_VL_CK (Fab-фрагмент)	4762 5	35,7
	6	14,5 756	1,0 0	47607	4760 7	4,54
	7	15,2 719	0,1 3	Ocrelizumab_VH_HC_hole_N-part, Ocrelizumab_VL_CK (Fab-фрагмент)	4762 5,6	4,6
			0,8 7	48458,9 (непироформа от массы 48442)	4845 8,9	
	8	15,4 873	1,0 0	Анти-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob_N-part, Анти- CSF1R_VL_CD1b (Fab-подобный фрагмент)	4844 2,1	22,27
	9	16,9 462	0,0 9	Анти-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob_N-part, Анти- CSF1R_VL_CD1b (Fab-подобный фрагмент)	4844 3	1,37
			0,9 1	Ocrelizumab_VH_HC_hole_N-part, Ocrelizumab_VL_CK (Fab-фрагмент)	4762 6,6	
02-009 GingisK han	1	7,90 917		Анти-CSF1R_VH_HC_hole-Cpart, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Cpart (Fc-фрагмент)	5024 2	16,75
	2	8,37 167		11425	1142 4,6	10,79
	3	11,5 2		36079	3607 8,6	1,12
	4	11,9 383		36062	3606 1,6	7,69
	5	13,2 667		36043	3604 3,5	0,9

	6	14,2 3		непироформа от массы 48600	4861 6,1	1,52
				48655	4865 5,1	
	7	14,5 133		Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Npart, Ocrelizumab_VL_CD1b (Fab-подобный фрагмент)	4860 0	3,73
	8	14,8 117		непироформа от массы 48600	4861 5,9	4,26
	9	15,0 45		Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Npart, Ocrelizumab_VL_CD1b (Fab-подобный фрагмент)	4859 8,4	31,1
	10	15,5 35		Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Npart, Ocrelizumab_VL_CD1b (Fab-подобный фрагмент)	4859 9,1	5,94
				48470	4847 0	
	11	16,2 95		Анти-CSF1R_VL_CK, Анти-CSF1R_VH_HC_hole-Npart, Анти-CSF1R_VH_HC_hole-Cpart, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Cpart (антитело с одним Fab-фрагментом, неэффективный протеолиз)	9781 1,8	4,23
				36062	3606 2	
				97693	9769 2,9	
				Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Npart, Ocrelizumab_VL_CD1b (Fab-подобный фрагмент)	4859 8,9	
	12	17,5 6		Анти-CSF1R_VH_HC_hole-Npart, Анти-CSF1R_VL_CK (Fab-фрагмент)	4746 8,9	9,99
	13	18,5 283		47451	4745 1	1,96

Массы 97811,8 Да и 97693 Да в случае образца 02-009 соответствуют молекуле с одним отрезанным Fab-подобным фрагментом.

Из представленных результатов видно, что все биспецифические химерные антитела по изобретению после протеолиза разделяются на фрагменты, соответствующие по массе Fc-фрагменту, Fab-фрагменту и Fab-подобному фрагменту, содержащему $\beta 2$ -микроглобулин и $\alpha 3$ -домен белка CD1b вместо СК- и СН1-доменов, что говорит о том, что технологическое решение, основанное на замене пары константных доменов СН1-СК на пару околосмембранных доменов из МНС или МНС-подобных белков, обеспечивает правильную сборку биспецифических химерных антител по изобретению.

Пример 12. Проверка влияния аминокислотных замен в димеризующем блоке на основе околосмембранных доменов МНС-подобного белка на термостабильность химерных антител.

Также были протестированы различные замены в димеризующем блоке и их влияние на чистоту и стабильность получаемых химерных антител. Тестирование проводилось в моноспецифическом формате, представляющем собой антитело, состоящее из двух тяжелых и двух легких цепей, в которых СН1 тяжелой цепи и СК домен легкой цепи заменены на $\beta 2$ -микроглобулин и $\alpha 3$ -домен белка CD1b, соответственно («прямая» ориентация димеризующего блока). Последовательности переменных доменов VH и VL взяты из антитела Progolimab (ЗАО Биокад). В последовательности $\beta 2$ -микроглобулина и $\alpha 3$ -домена белка CD1b были введены мутации, указанные в таблице 13. Последовательности $\alpha 3$ -домена белка CD1b также содержали С-концевые удлинения, указанные в таблице 13. В таблице 13 нумерация позиций, в которых вводились мутации, представлена от начала димеризующего блока, а также приведено соответствие позиций, пронумерованных согласно нумерации аминокислот цепей антител EU (Edelman G.M. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 1969, сс. 78- 85; Kabat E.A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991)». Далее в тексте приведена

нумерация позиций, в которых вводились замены, от начала димеризующего блока, положение замен в хиндж-регионе указано согласно нумерации EU.

Таблица 13. Описание мутантных вариантов димеризующего блока на основе β 2-микроглобулина и α 3-домена белка CD1b.

Антитело	Мутации в тяжелой цепи (β 2-микроглобулин). Нумерация от начала блока	Мутации в тяжелой цепи. Нумерация по EU	Мутации и С-концевое удлинение в легкой цепи (CD1b)	Мутации в легкой цепи. Нумерация по EU	Комментарий
03-001	R12C	R129C	N57C и удлинение GSC на С-конце	N164C и удлинение GSC на С-конце	молекула с 2 S-S-мостиками в димеризующем блоке
03-002	R12C	R129C, C220A	N57C и удлинение GS на С-конце	N164C и удлинение GS на С-конце	молекула с 1 S-S-мостиком внутри димеризующего блока
03-003			N59A и удлинение GSC на С-конце	N166A и удлинение GSC на С-конце	Молекула с удаленным потенциальным сайтом гликозилирования в легкой цепи
03-004			N59D и удлинение GSC на С-конце	N166D и удлинение GSC на С-конце	Молекула с удаленным потенциальным сайтом гликозилирования в легкой цепи
03-005	R12C	R129C	N57C, N59A и удлинение GSC на С-конце	N164C, N166A и удлинение GSC на С-конце	молекула с 2 S-S-мостиками в димеризующем блоке и удаленным потенциальным сайтом

					гликозилирования в легкой цепи
03-006	R12C	R129C	N57C, N59D и удлинение GSC на С-конце	N164C, N166D и удлинение GSC на С- конце	молекула с 2 S-S- мостиками в димеризующем блоке и удаленным потенциальным сайтом гликозилирования в легкой цепи
03-007	R12C	R129C, C220A	N57C, N59A и удлинение GS на С-конце	N164C, N166A и удлинение GS на С-конце	молекула с 1 S-S- мостиком внутри димеризующего блока и удаленным потенциальным сайтом гликозилирования в легкой цепи
03-008	R12C	R129C, C220A	N57C, N59D и удлинение GS на С-конце	N164C, N166D и удлинение GS на С-конце	молекула с 1 S-S- мостиком внутри димеризующего блока и удаленным потенциальным сайтом гликозилирования в легкой цепи

На фиг. 10 представлен результат SDS-гель-электрофореза наработанных антител в нередуцирующих условиях. В качестве контролей на дорожках 1 и 2 (фиг. 10А и 10 Б) нанесены образцы Prolgolimab (классический IgG1) и 01-011 (образец с исходным димеризующим блоком на основе околосмембранных доменов МНС-подобного белка, см. пример 5), соответственно. Из представленных результатов видно, что подвижность мажорного фрагмента всех модифицированных образцов

соответствует полноразмерной молекуле (см. фиг.10 А дорожки 3 – 8, фиг.10 Б дорожки 3 - 4), что говорит о том, что внесенные модификации не влияют на сборку полноразмерной молекулы. По данным эВЭЖХ (таблица 14) видно, что некоторые модификации приводят к уменьшению содержания мономера и повышению количества низкомолекулярных фрагментов (антитела 03-001, 03-003, 03-005, 03-006, 03-007), однако среди них есть и те, кто продемонстрировал увеличение процентного содержания мономера (03-002, 03-004, 03-008). Также был проведен анализ температуры агрегации методом динамического светорассеяния полученных антител, результат которого также представлен в таблице 14.

Таблица 14. Продуктивность, чистота и температура агрегации моноспецифических химерных антител, содержащих модифицированные димеризующие блоки на основе околосмембранных доменов МНС-подобных белков.

Антитело	Продуктивность, 9 день, мг/л	Чистота по эВЭЖХ			Температура агрегации , °C
		Агрегаты, %	Мономер, %	Фрагменты, %	
Prolgolimab	252,4	3,5	94,7	1,8	66,34
01-011	302,6	1,7	80,6	17,7	55,23
03-001	192,7	4,2	61,5	34,3	59,09
03-002	310,8	3,9	82,9	13,1	58,16
03-003	229,6	3,3	62,2	34,4	42,14
03-004	189,9	5,0	84,3	10,8	61,13
03-005	175,0	2,7	69,7	27,6	58,66
03-006	182,2	2,0	71,7	26,3	58,91
03-007	297,5	5,8	78,4	15,9	52,07
03-008	199,8	3,4	88,6	8,0	58,07

Из представленных результатов видно, что варианты антител, продемонстрировавшие увеличение относительного содержания мономера по эВЭЖХ, также имеют и повышенную по сравнению с немодифицированным вариантом димеризующего блока на основе МНС-подобных белков температуру агрегации.

Формула изобретения

1. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело, где указанное антитело содержит:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с первым антигеном;

где первая легкая цепь содержит переменный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи;

где первая тяжелая цепь содержит переменный домен тяжелой цепи и константные домены тяжелой цепи антитела, включающие первый (CH1) константный домен тяжелой цепи и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи;

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося со вторым антигеном,

где вторая легкая цепь содержит переменный домен легкой цепи и константный домен, который выбирают из группы:

первого околомембранного домена МНС (главный комплекс гистосовместимости) или

первого околомембранного домена МНС-подобного белка;

где вторая тяжелая цепь, содержит переменный домен тяжелой цепи, константный домен, который выбирают из группы:

второго околомембранного домена МНС (главный комплекс гистосовместимости) или

второго околомембранного домена МНС-подобного белка;

и мономер Fc-фрагмента, содержащий второй (CH2) и третий (CH3) константные домены тяжелой цепи;

при этом первый околомембранный домен МНС или МНС-подобного белка и второй околомембранный домен МНС или МНС-подобного белка

образуют между собой гетеродимер, который стабилизирован дисульфидной связью;

где СН3-домен одной тяжелой цепи и СН3-домен другой тяжелой цепи соприкасаются друг с другом поверхностями, которые изменены для формирования двухвалентного биспецифического химерного антитела, причем данные изменения в СН3 доменах тяжелых цепей представляют собой замены для обеспечения гетеродимеризации.

2. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п.1, где первый околомембранный домен МНС может быть выбран из группы, включающей:

первый околомембранный домен МНС класса I (главный комплекс гистосовместимости класса I),

первый околомембранный домен МНС класса II (главный комплекс гистосовместимости класса II),

модифицированный вариант первого околомембранного домена МНС класса I или

модифицированный вариант первого околомембранного домена МНС класса II.

3. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п.1, где второй околомембранный домен МНС может быть выбран из группы, включающей:

второй околомембранный домен МНС класса I (главный комплекс гистосовместимости класса I),

второй околомембранный домен МНС класса II (главный комплекс гистосовместимости класса II),

модифицированный вариант второго околомембранного домена МНС класса I или

модифицированный вариант второго околомембранного домена МНС класса II.

4. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по любому из пп.2-3, где МНС класса II выбирают из группы: HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ или HLA-DR.

5. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по любому из пп.2-3, где МНС класса I выбирают из группы: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F или HLA-G.

6. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п.1, где первый околомембранный домен МНС-подобного белка может быть выбран из группы, включающей:

первый околомембранный домен CD1 (кластер дифференцировки 1),
первый околомембранный домена HFE (белок гемохроматоза),
модифицированный вариант первого околомембранного домена CD1
или

модифицированный вариант первого околомембранного домена HFE.

7. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п.1, где второй околомембранный домен МНС-подобного белка может быть выбран из группы, включающей:

второй околомембранный домен CD1 (кластер дифференцировки 1),
второй околомембранный домена HFE (белок гемохроматоза),
модифицированный вариант второго околомембранного домена CD1
или

модифицированный вариант второго околомембранного домена HFE.

8. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по любому из пп.6-7, где CD1 выбирают из группы: CD1a, CD1b, CD1c, CD1d или CD1e.

9. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п.1, где переменный фрагмент второй легкой цепи (VL) отделен от первого

околомембранного домена МНС или МНС-подобного белка линкером длиной от 1 до 25 аминокислот и/или вариабельный фрагмент второй тяжелой цепи (VH) отделен от второго околомембранного домена МНС или МНС-подобного белка линкером длиной от 1 до 25 аминокислот.

10. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п.1, где

а) СН3-домен одной тяжелой цепи изменен так, что на поверхности СН3-домена одной тяжелой цепи, которая соприкасается с поверхностью СН3-домена второй тяжелой цепи в двухвалентном биспецифическом антителе, аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, который имеет большую по объему боковую цепь, что приводит к созданию выпуклости на поверхности СН3-домена одной тяжелой цепи, которая может помещаться в полость на поверхности СН3-домена другой тяжелой цепи,

и

б) СН3-домен другой тяжелой цепи изменен так, что на поверхности СН3-домена второй тяжелой цепи, которая соприкасается с поверхностью СН3-домена первой тяжелой в двухвалентном биспецифическом антителе, аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, который имеет меньшую по объему боковую цепь, что приводит к созданию полости на поверхности СН3-домена второй тяжелой цепи, в которую может помещаться выпуклость на поверхности раздела СН3-домена первой тяжелой цепи;

где указанный аминокислотный остаток, который имеет большую по объему боковую цепь, выбран из группы, включающей аргинин (R), фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W),

и где указанный аминокислотный остаток, который имеет меньшую по объему боковую цепь, выбран из группы, включающей аланин (A), серин (S), треонин (T), валин (V).

11. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 1, где константный домен первой легкой цепи антитела выбирают из СК или CL.

12. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 1, где СНЗ-домены антитела дополнительно изменены путем интродукции цистеина (C) в качестве аминокислоты в соответствующие положения каждого СНЗ-домена, так что дисульфидный мостик может образовываться между обоими СНЗ-доменами.

13. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 10, где СНЗ-домен одной тяжелой цепи изменен с образованием Knob, а СНЗ-домен другой тяжелой цепи изменен с образованием Hole или наоборот.

14. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 13, где СНЗ-домен одной тяжелой цепи имеет аминокислотные замены S354C/T366W, а СНЗ-домен другой тяжелой цепи имеет аминокислотные замены Y349C/T366S/L368A/Y407V; или

где СНЗ-домен одной тяжелой цепи имеет аминокислотные замены Y349C/T366S/L368A/Y407, а СНЗ-домен другой тяжелой цепи имеет аминокислотные замены S354C/T366W.

15. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 1, где первый околомембранный домен МНС и второй околомембранный домен МНС, соответственно, представляют собой $\alpha 2$ домен МНС II и $\beta 2$ домен МНС II, которые образуют между собой гетеродимер.

16. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 15, где $\alpha 2$ домен МНС II имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 38, а $\beta 2$ домен МНС II имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 39.

17. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 1, где первый околомембранный домен МНС и второй околомембранный домен МНС, соответственно, представляют собой $\beta 2$ домен МНС II и $\alpha 2$ домен МНС II, которые образуют между собой гетеродимер.

18. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 17, где $\beta 2$ домен МНС II имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 39, а $\alpha 2$ домен МНС II имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 38.

19. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 1, где первый околомембранный домен МНС и второй околомембранный домен МНС, соответственно, представляют собой модифицированный вариант $\alpha 2$ домена МНС II и модифицированный вариант $\beta 2$ домена МНС II, которые образуют между собой гетеродимер; или

где первый околомембранный домен МНС и второй околомембранный домен МНС, соответственно, представляют собой модифицированный вариант $\beta 2$ домена МНС II и модифицированный вариант $\alpha 2$ домена МНС II, которые образуют между собой гетеродимер; или

где первый околомембранный домен МНС и второй околомембранный домен МНС, соответственно, представляют собой $\alpha 3$ домен МНС I и $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$), которые образуют между собой гетеродимер.

20. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 19, где $\alpha 3$ домен МНС I имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы SEQ ID NO: 1-29, а $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$) имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46.

21. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 1, где первый околомембранный домен МНС и второй околомембранный домен

МНС, соответственно, представляют собой $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$) и $\alpha 3$ домен МНС I, которые образуют между собой гетеродимер.

22. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 21, где $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$) имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, а $\alpha 3$ домен МНС I имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы SEQ ID NO: 1-29.

23. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 1, где первый околосмембранный домен МНС и второй околосмембранный домен МНС, соответственно, представляют собой модифицированный вариант $\alpha 3$ домена МНС I и модифицированный вариант $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$), которые образуют между собой гетеродимер; или

где первый околосмембранный домен МНС и второй околосмембранный домен МНС, соответственно, представляют собой модифицированный вариант $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$) и модифицированный вариант $\alpha 3$ домена МНС I, которые образуют между собой гетеродимер.

24. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 23, где модифицированный вариант $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$) имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 48.

25. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 1, где первый околосмембранный домен МНС-подобного белка и второй околосмембранный домен МНС-подобного белка, соответственно, представляют собой $\alpha 3$ домен CD1 и $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$), которые образуют между собой гетеродимер.

26. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 25, где $\alpha 3$ домен CD1 имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы SEQ ID NO: 40-44, а $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$) имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46.

27. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 1, где первый околомембранный домен МНС-подобного белка и второй околомембранный домен МНС-подобного белка, соответственно, представляют собой $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$) и $\alpha 3$ домен CD1, которые образуют между собой гетеродимер.

28. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 27, где $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$) имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, а $\alpha 3$ домен CD1 имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы SEQ ID NO: 40-44.

29. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 1, где первый околомембранный домен МНС-подобного белка и второй околомембранный домен МНС-подобного белка, соответственно, представляют собой модифицированный вариант $\alpha 3$ домена CD1 и модифицированный вариант $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$), которые образуют между собой гетеродимер.

30. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 29, где модифицированный вариант $\alpha 3$ домена CD1 имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы SEQ ID NO: 49-56, а модифицированный вариант $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$) имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 48.

31. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 1, где первый околомембранный домен МНС-подобного белка и второй околомембранный домен МНС-подобного белка, соответственно, представляют собой модифицированный вариант $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$) и модифицированный вариант $\alpha 3$ домена CD1, которые образуют между собой гетеродимер.

32. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 31, где модифицированный вариант $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$) имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 48, а модифицированный вариант $\alpha 3$ домена CD1 имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы SEQ ID NO: 49-56 или SEQ ID NO: 109.

33. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 1, где первый околосмембранный домен МНС-подобного белка и второй околосмембранный домен МНС-подобного белка, соответственно, представляют собой $\alpha 3$ домен HFE и $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$), которые образуют между собой гетеродимер.

34. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 33, где $\alpha 3$ домен HFE имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, а $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$) имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46.

35. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 1, где первый околосмембранный домен МНС-подобного белка и второй околосмембранный домен МНС-подобного белка, соответственно, представляют собой $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$) и $\alpha 3$ домен HFE, которые образуют между собой гетеродимер.

36. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 35, где $\beta 2$ микроглобулин ($\beta 2M$) имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, а $\alpha 3$ домен HFE имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45.

37. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 1, где первый околосмембранный домен МНС-подобного белка и второй околосмембранный домен МНС-подобного белка, соответственно, представляют собой модифицированный вариант $\alpha 3$ домена HFE и

модифицированный вариант $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$), которые образуют между собой гетеродимер; или

где первый околосмембранный домен МНС-подобного белка и второй околосмембранный домен МНС-подобного белка, соответственно, представляют собой модифицированный вариант $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$) и модифицированный вариант $\alpha 3$ домена HFE, которые образуют между собой гетеродимер.

38. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 37, где модифицированный вариант $\beta 2$ микроглобулина ($\beta 2M$) имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 48.

39. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по любому из пп. 2-3, 6-7, 19, 23, 29, 31 и 37, где под модифицированным вариантом подразумевается вариант, включающий замены на цистеин (C) для образования дисульфидного мостика между цепями гетеродимера, полученного из первого и второго околосмембранных доменов МНС или МНС-подобного белка; или

где под модифицированным вариантом подразумевается вариант, включающий одну или более замен в различных позициях околосмембранных доменов МНС или МНС-подобного белка, приводящие к увеличению термодинамической стабильности T_m более чем на 1 градус Цельсия в сравнении с дикой формой околосмембранных доменов МНС или МНС-подобного белка, соответственно; или

где под модифицированным вариантом подразумевается вариант, включающий одну или более замен в различных позициях околосмембранных доменов МНС или МНС-подобного белка, приводящие к уменьшению количества агрегатов на более чем 5% при концентрации выше 10 мг/ мл в

сравнении с дикой формой околосмембранных доменов МНС или МНС-подобного белка, соответственно; или

где под модифицированным вариантом подразумевается вариант, включающий одну или более замен в различных позициях околосмембранных доменов МНС или МНС-подобного белка, приводящие удалению сайтов гликозилирования в сравнении с дикой формой околосмембранных доменов МНС или МНС-подобного белка, соответственно.

40. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 1, где переменный домен первой легкой цепи и переменный домен второй легкой цепи идентичны.

41. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 1, где Fc-фрагмент относится к IgG.

42. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 41, где изотип Fc-фрагмента выбирают из группы: IgG1, IgG2, или IgG4 человека.

43. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 1, где в мономере Fc-фрагмента дополнительно вводят замены, приводящие к отсутствию ADCC, CDC и/или ADCP свойств у двухвалентного биспецифического антитела.

44. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 43, где в мономере Fc-фрагмента дополнительно вводят замены LALA (L234A и L235A).

45. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 1, где в мономере Fc-фрагмента дополнительно вводят замены, приводящие к пролонгированному действию антитела.

46. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 45, где в мономере Fc-фрагмента дополнительно вводят заменыYTE (M252Y, S254T и T256E).

47. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 43, где в мономере Fc-фрагмента дополнительно вводят замену E345R.

48. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 1, которое специфически связывается с CD20 и CD3; или

которое специфически связывается с BCMA и CD3; или

которое специфически связывается с PD-L1 и CD47; или

которое специфически связывается с фактором свертывания крови 9 (FIX) и фактором свертывания крови 10 (FX); или

которое специфически связывается с GD2 и CD3; или

которое специфически связывается с AXL и CD3; или

которое специфически связывается с PD-L1 и TGF beta.

49. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 1, где первый околомембранный домен МНС или МНС-подобного белка и второй околомембранный домен МНС или МНС-подобного белка образуют между собой гетеродимер, который стабилизирован дисульфидной связью за счет мутации или мутаций в первом и/или втором околомембранном домене для образования S-S связи (дисульфидной связи, цистеинового мостика) между первым и вторым околомембранным доменом МНС или МНС-подобного белка.

50. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 1, где первый околомембранный домен МНС или МНС-подобного белка и второй околомембранный домен МНС или МНС-подобного белка образуют между собой гетеродимер, который стабилизирован дисульфидной связью за счет удлинения первого околомембранного домена МНС или МНС-подобного белка на одну или несколько (от 1 до 10) аминокислот на С-конце и с терминальным Cys на С-конце для образования S-S связи (дисульфидной связи, цистеинового мостика) между первым околомембранным доменом МНС или МНС-подобного белка и шарниром (hinge).

51. Двухвалентное биспецифическое химерное антитело по п. 50, где удлинение первого околомембранного домена МНС или МНС-подобного белка представляет собой GSC.

52. Выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует двухвалентное биспецифическое химерное антитело по любому из пп. 1-51.

53. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 52, где нуклеиновая кислота представляет собой ДНК.

54. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп. 52-53.

55. Способ получения клетки-хозяина для получения двухвалентного биспецифического химерного антитела по любому из пп. 1-51, включающий трансформирование клетки вектором по п. 54.

56. Клетка-хозяин для получения двухвалентного биспецифического химерного антитела по любому из пп. 1-51, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из пп. 52-53.

57. Способ получения двухвалентного биспецифического химерного антитела по пп. 1-51, где способ включает следующие этапы:

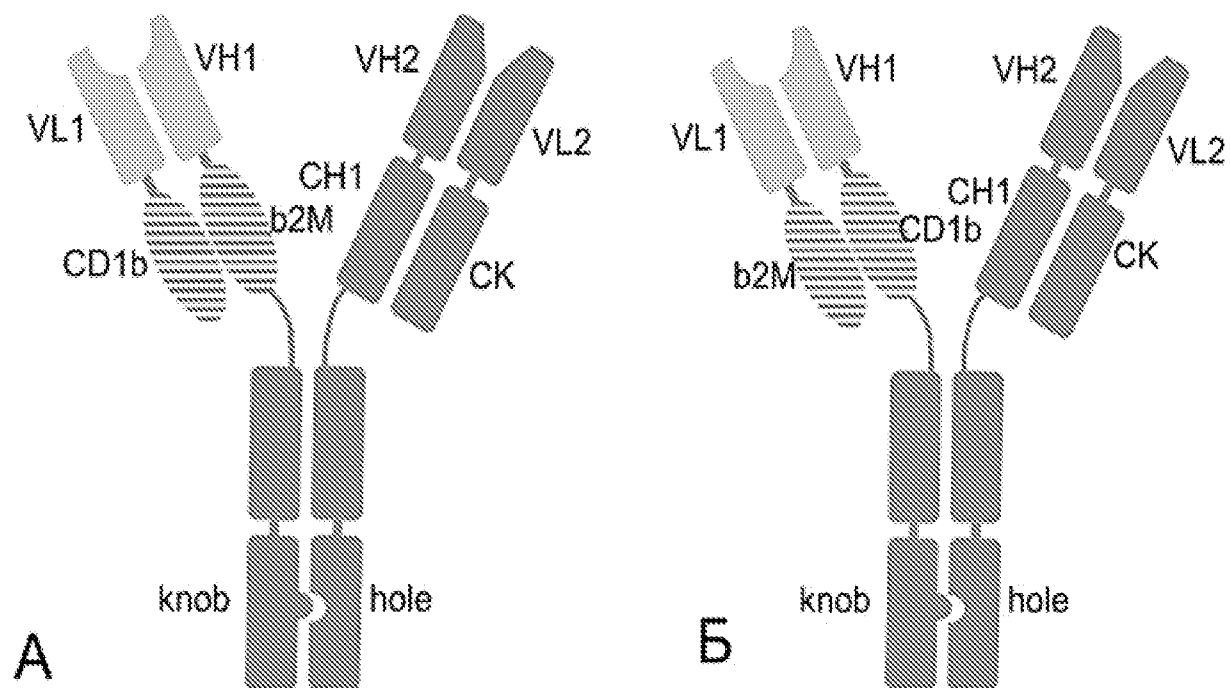
а) трансформации клетки-хозяина

- экспрессионными векторами, которые содержат молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие первую легкую цепь и первую тяжелую цепь биспецифического химерного антитела,

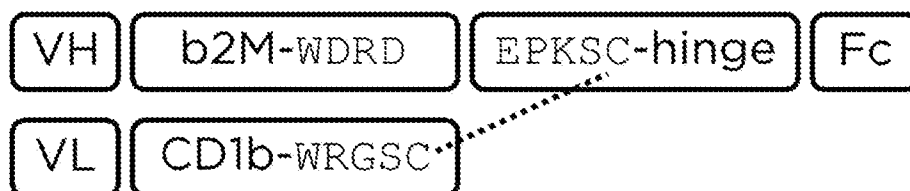
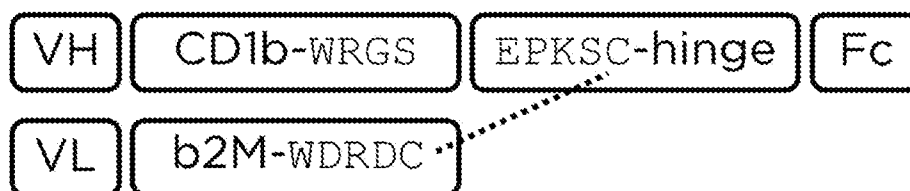
- экспрессионными векторами, которые содержат молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь биспецифического химерного антитела,

б) культивирование клетки-хозяина в условиях, которые позволяют синтезировать указанное двухвалентное биспецифическое химерное антитело; и

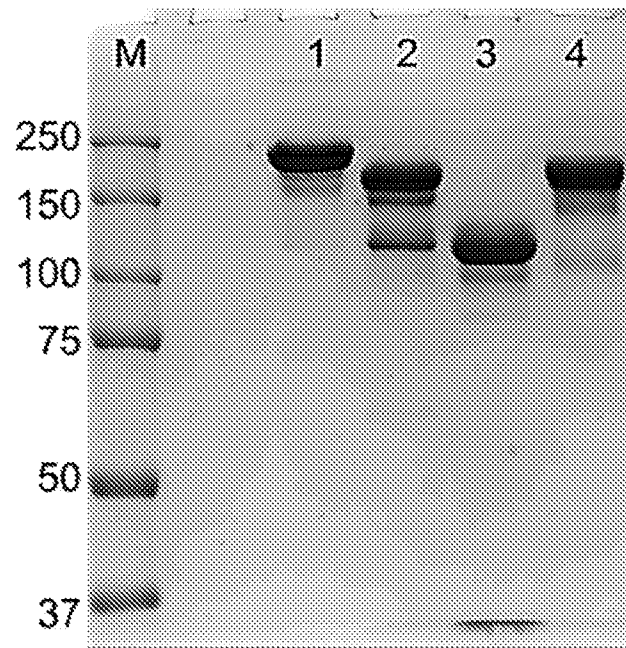
в) выделение указанного двухвалентного биспецифического антитела из культуры клеток.



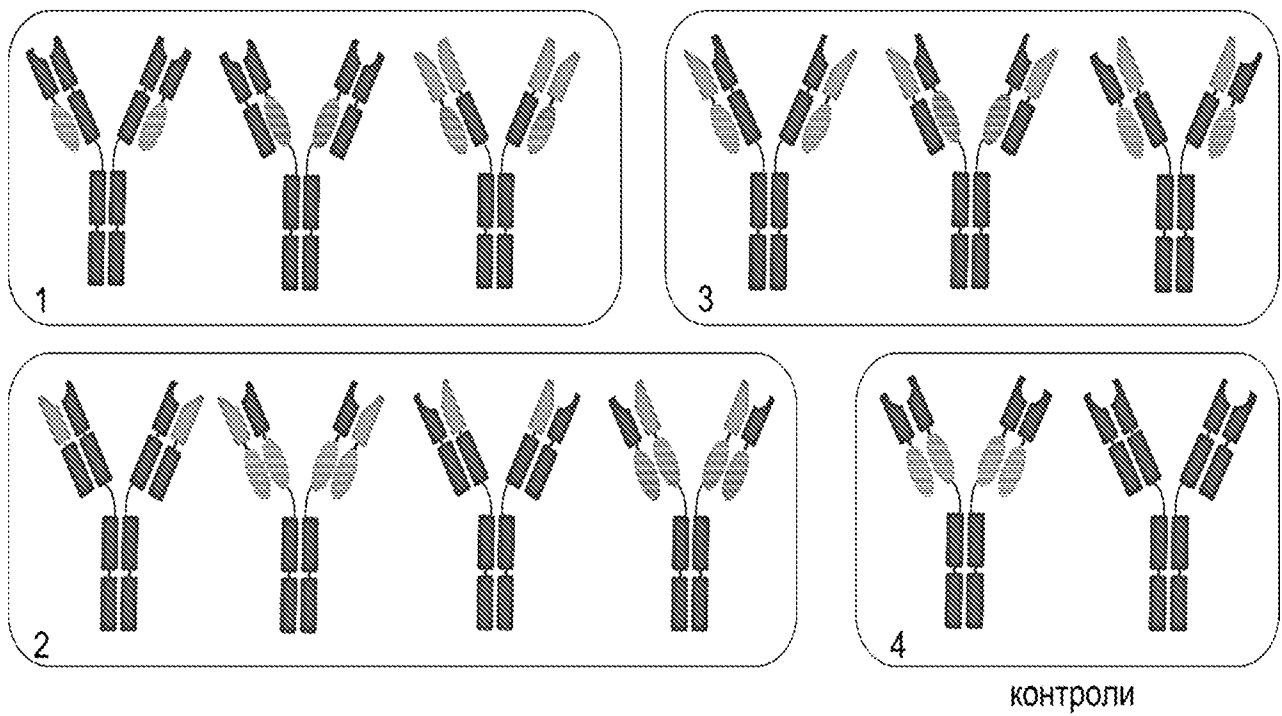
Фиг. 1

A**Б**

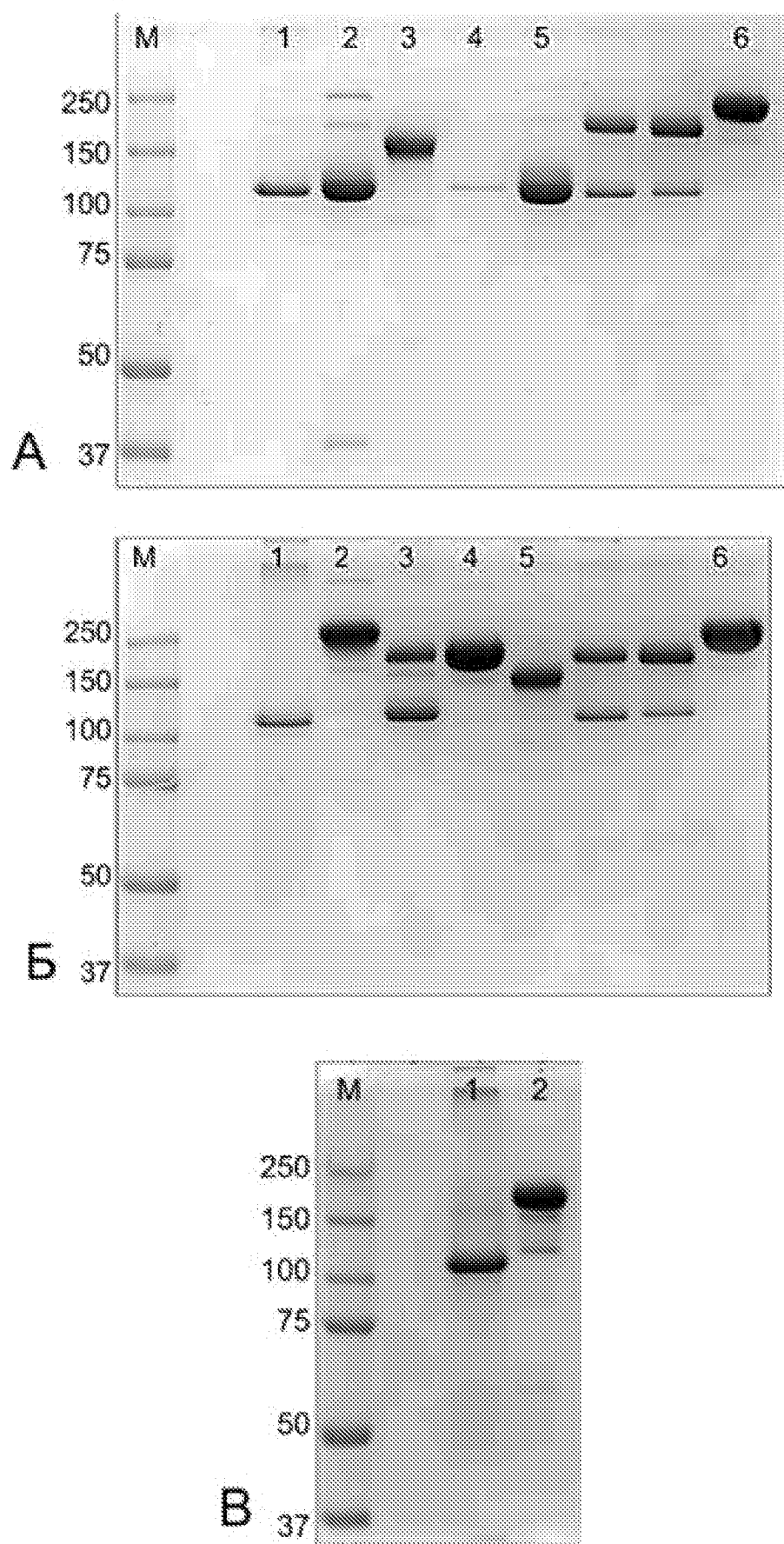
Фиг. 2



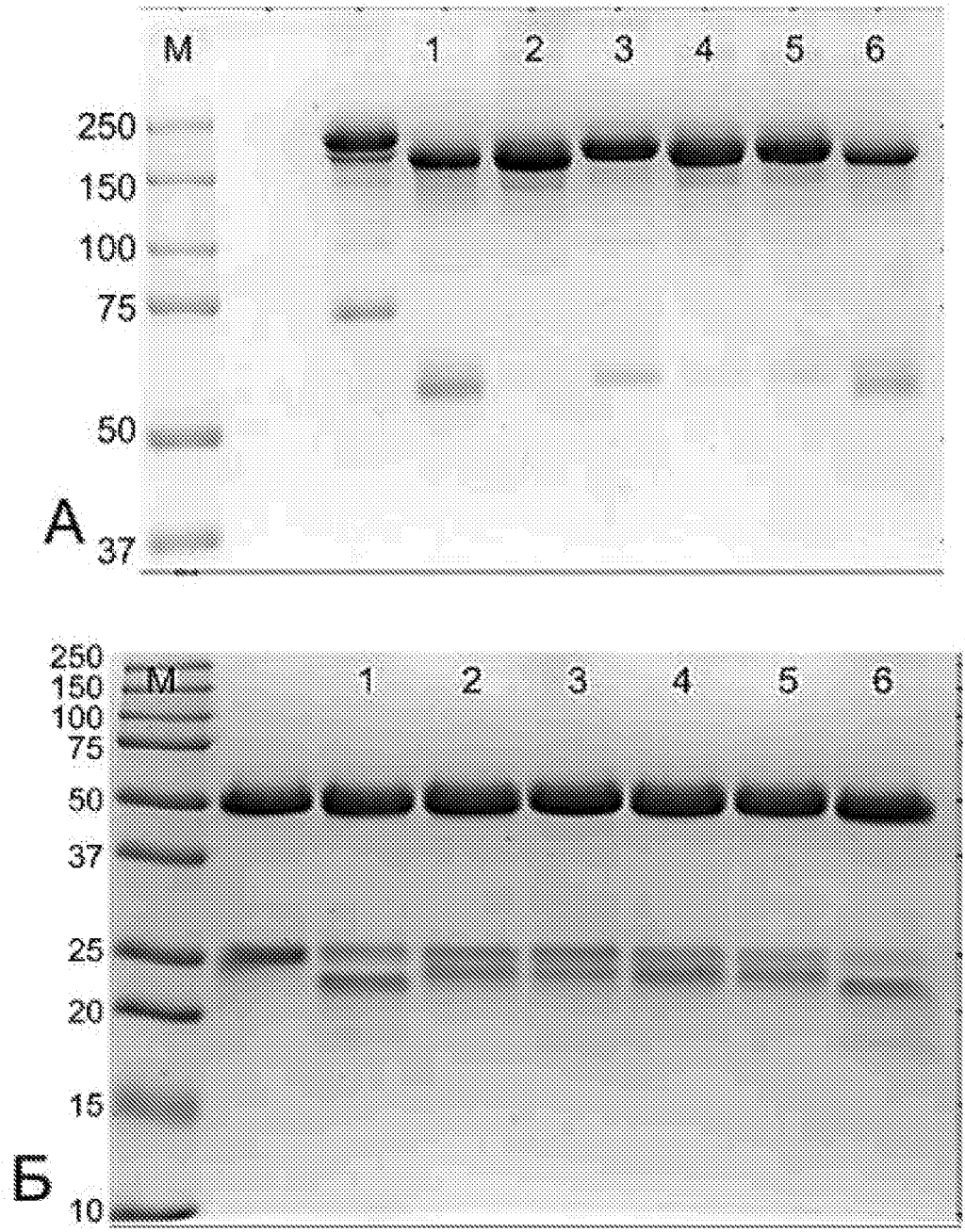
Фиг. 3



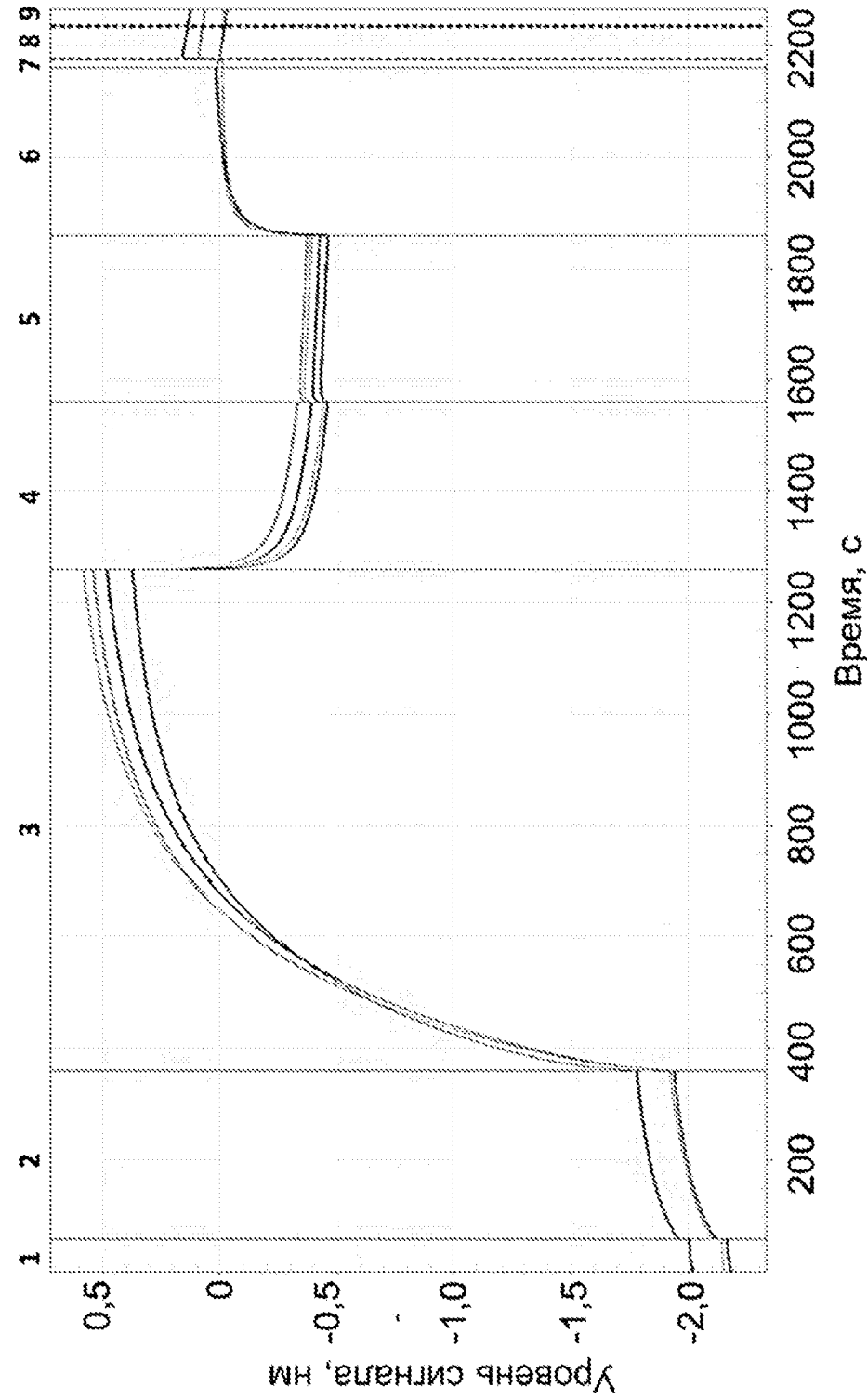
Фиг. 4



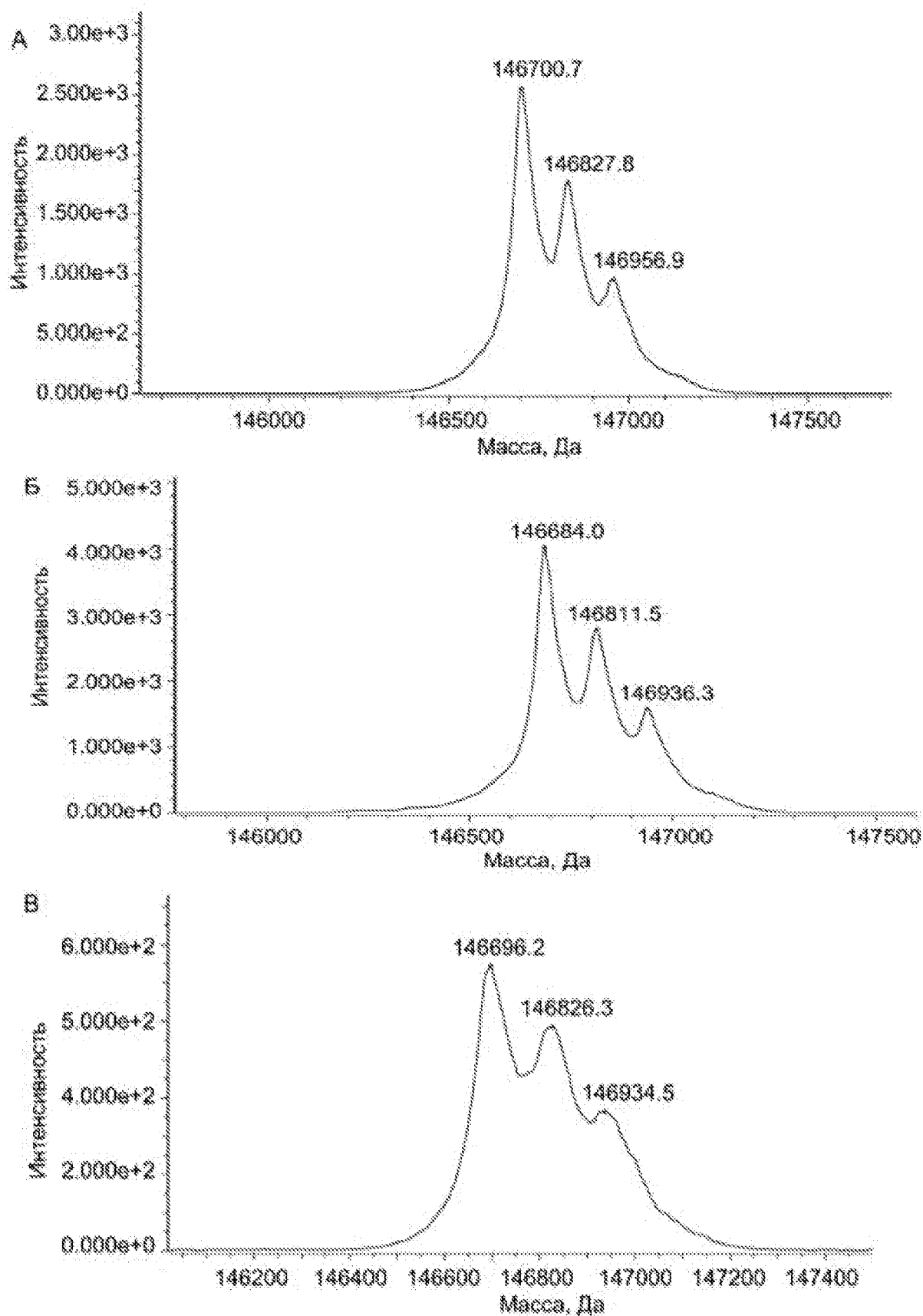
Фиг. 5



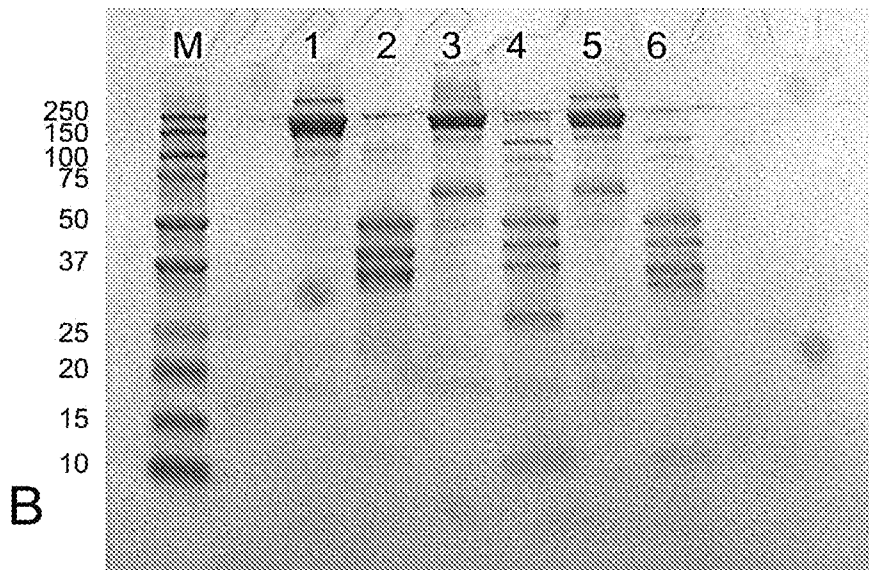
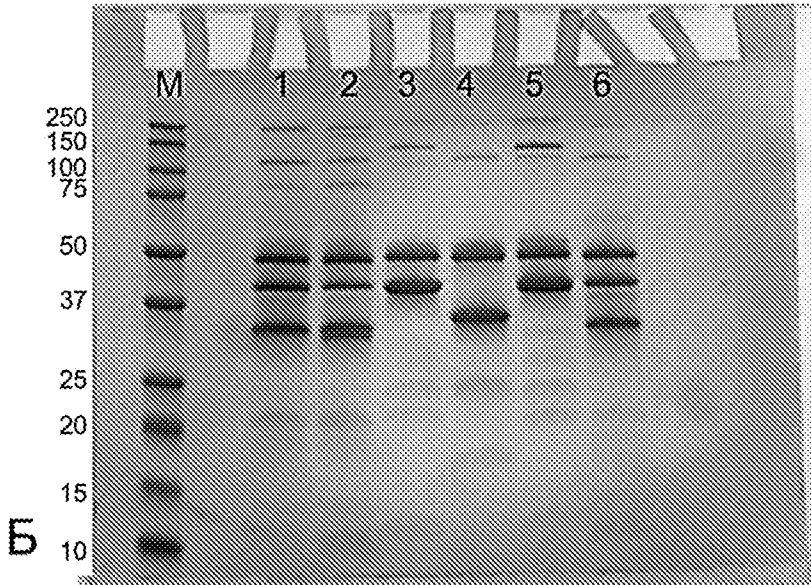
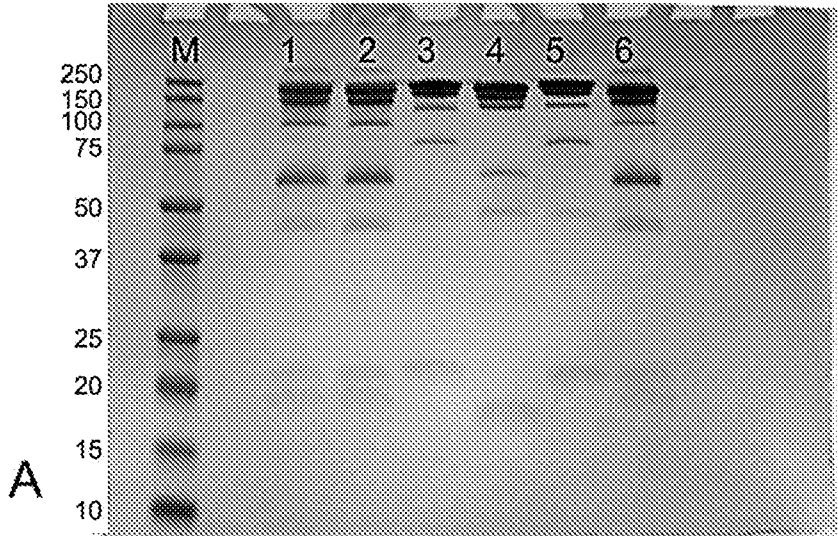
Фиг. 6

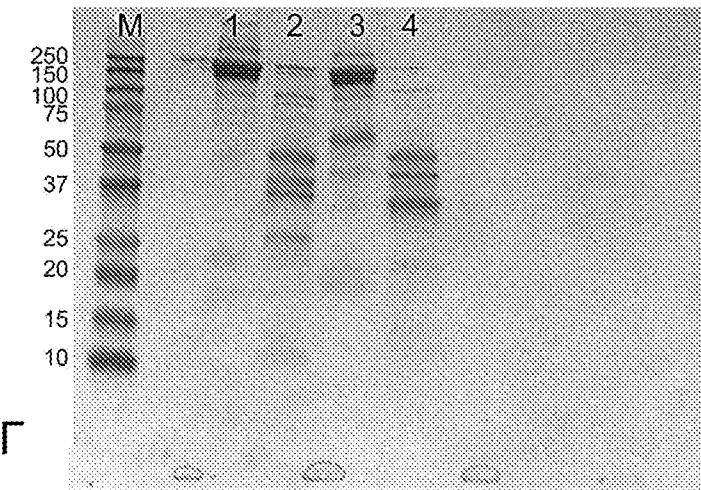


Фиг. 7

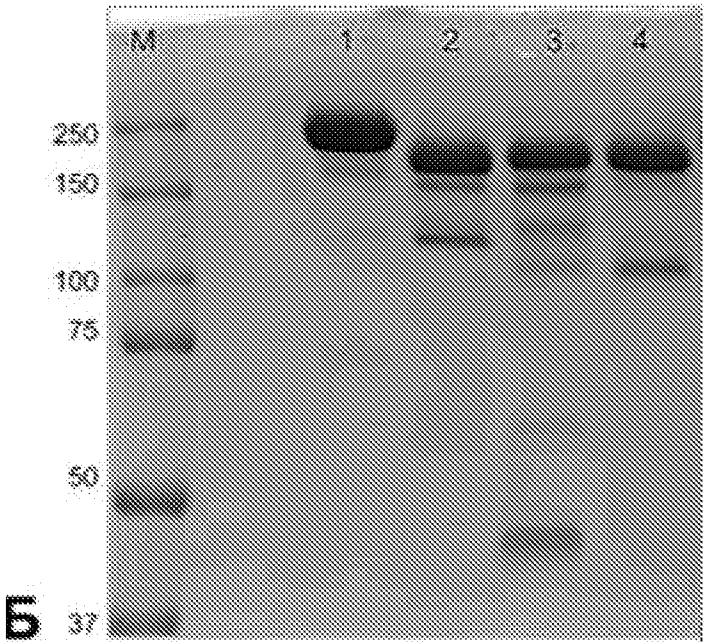
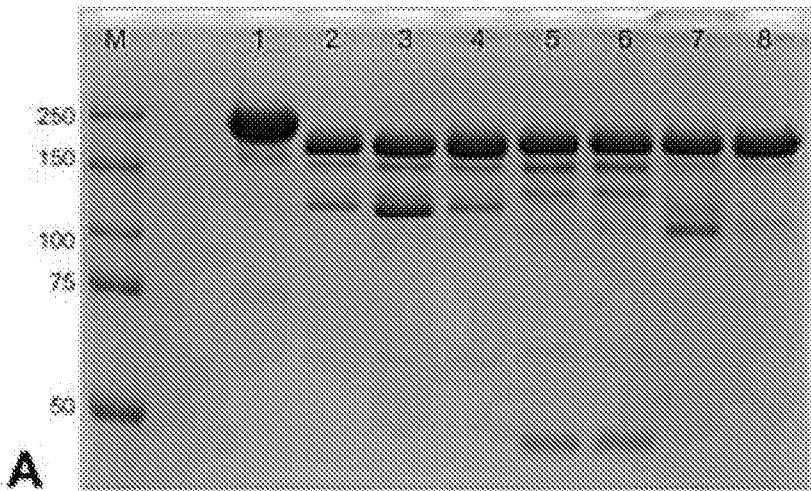


Фиг. 8





Фиг. 9



Фиг. 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2022/050281

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(see the supplemental sheet)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 16/28, 16/46, C12N 15/13, 15/63, C12P 21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PatSearch (RUPTO Internal), USPTO, PAJ, Espacenet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	SCHMITTNAEGEL Martina et al. A New Class of Bifunctional Major Histocompatibility Class I Antibody Fusion Molecules to Redirect CDS T Cells. Molecular Cancer Therapeutics, 2016, 15(9), pp.2130-2142, figure 1, the abstract, Results, Discussion, Materials and Methods	1-3, 5, 9-13, 23, 39-42, 49, 50 4, 6-8, 14-22, 25-29, 31, 33, 35, 37, 43-48, 51-57 24, 30, 32, 34, 36, 38
Y	WO 2016/049641 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 31.03.2016, the claims, paragraph [00344]	4, 15-22
Y	WO 2018/053069 A1 (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC) 22.03.2018, the claims, paragraphs [00131], [00135], [00152], [00226], [00197]	6, 7, 8, 25-29, 31, 33, 35, 37



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 January 2023 (18.01.2023)

Date of mailing of the international search report

02 February 2023 (02.02.2023)

Name and mailing address of the ISA/
RU

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2022/050281

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	RU 2698969 C2 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 02.09.2019, pages 7, 9, 10, 21, 62, 65, examples 1-8, the claims	14, 43, 44-47, 52-57
Y	GenBank: EAX03641.1, 23.03.2015	16, 18
Y	GenBank: CDO67975.1, 17.04.2014	20, 22
Y	GenBank: AAX29951.1, 26.07.2016	20, 22, 26, 28
Y	GenBank: CAA28049.1, 25.07.2016	26, 28
Y	SCHUSTER Stephen J. Bispecific antibodies for the treatment of lymphomas: Promises and challenges. SUPPLEMENT ARTICLE, 2021, pp.113-116, abstract	48
Y	RU 2518291 C2 (PFIZER VACCINS ELELCI) 10.06.2014, page 25	51
A	SCHMITTNAEGEL Martina et al. A New Class of Bifunctional Major Histocompatibility Class I Antibody Fusion Molecules to Redirect CDS T Cells. Molecular Cancer Therapeutics, 2016, 15(9), pp.2130-2142, figure 1, abstract, Results, Discussion, Materials and Methods	1-57

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2022/050281

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter 1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ		Номер международной заявки PCT/RU 2022/050281																		
A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ <i>C07K 16/28</i> (2006.01) <i>C07K 16/46</i> (2006.01) <i>C12N 15/13</i> (2006.01) <i>C12N 15/63</i> (2006.01) <i>C12P 21/08</i> (2006.01) Согласно Международной патентной классификации МПК																				
B. ОБЛАСТЬ ПОИСКА Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации) C07K 16/28, 16/46, C12N 15/13, 15/63, C12P 21/08 Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины) PatSearch (RUPTO Internal), USPTO, PAJ, Espacenet																				
C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ: <table border="1"> <thead> <tr> <th>Категория*</th> <th>Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей</th> <th>Относится к пункту №</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>SCHMITTNAEGEL Martina et al. A New Class of Bifunctional Major Histocompatibility Class I Antibody Fusion Molecules to Redirect CD8 T Cells. Molecular Cancer Therapeutics, 2016, 15(9), pp.2130-2142, фигура 1, реферат, Results, Discussion, Materials and Methods</td> <td>1-3, 5, 9-13, 23, 39-42, 49, 50</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>4, 6-8, 14-22, 25-29, 31, 33, 35, 37, 43-48, 51-57</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>24, 30, 32, 34, 36, 38</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2016/049641 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 31.03.2016, формула, параграф [00344]</td> <td>4, 15-22</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2018/053069 A1 (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC) 22.03.2018, формула, параграфы [00131], [00135], [00152], [00226], [00197]</td> <td>6, 7, 8, 25-29, 31, 33, 35, 37</td> </tr> </tbody> </table>			Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №	X	SCHMITTNAEGEL Martina et al. A New Class of Bifunctional Major Histocompatibility Class I Antibody Fusion Molecules to Redirect CD8 T Cells. Molecular Cancer Therapeutics, 2016, 15(9), pp.2130-2142, фигура 1, реферат, Results, Discussion, Materials and Methods	1-3, 5, 9-13, 23, 39-42, 49, 50	Y		4, 6-8, 14-22, 25-29, 31, 33, 35, 37, 43-48, 51-57	A		24, 30, 32, 34, 36, 38	Y	WO 2016/049641 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 31.03.2016, формула, параграф [00344]	4, 15-22	Y	WO 2018/053069 A1 (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC) 22.03.2018, формула, параграфы [00131], [00135], [00152], [00226], [00197]	6, 7, 8, 25-29, 31, 33, 35, 37
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №																		
X	SCHMITTNAEGEL Martina et al. A New Class of Bifunctional Major Histocompatibility Class I Antibody Fusion Molecules to Redirect CD8 T Cells. Molecular Cancer Therapeutics, 2016, 15(9), pp.2130-2142, фигура 1, реферат, Results, Discussion, Materials and Methods	1-3, 5, 9-13, 23, 39-42, 49, 50																		
Y		4, 6-8, 14-22, 25-29, 31, 33, 35, 37, 43-48, 51-57																		
A		24, 30, 32, 34, 36, 38																		
Y	WO 2016/049641 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 31.03.2016, формула, параграф [00344]	4, 15-22																		
Y	WO 2018/053069 A1 (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC) 22.03.2018, формула, параграфы [00131], [00135], [00152], [00226], [00197]	6, 7, 8, 25-29, 31, 33, 35, 37																		
☒ последующие документы указаны в продолжении графы C. ☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении																				
<table border="0"> <tr> <td> * Особые категории ссылочных документов: "А" документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным "D" документ, цитируемый заявителем в международной заявке "Е" более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее "L" документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано) "O" документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д. "P" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета </td> <td> "Т" более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение "Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности "Y" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста "&" документ, являющийся патентом-аналогом </td> </tr> </table>			* Особые категории ссылочных документов: "А" документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным "D" документ, цитируемый заявителем в международной заявке "Е" более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее "L" документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано) "O" документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д. "P" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета	"Т" более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение "Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности "Y" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста "&" документ, являющийся патентом-аналогом																
* Особые категории ссылочных документов: "А" документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным "D" документ, цитируемый заявителем в международной заявке "Е" более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее "L" документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано) "O" документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д. "P" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета	"Т" более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение "Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности "Y" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста "&" документ, являющийся патентом-аналогом																			
Дата действительного завершения международного поиска 18 января 2023 (18.01.2023)		Дата отправки настоящего отчета о международном поиске 02 февраля 2023 (02.02.2023)																		
Наименование и адрес ISA/RU: Федеральный институт промышленной собственности, Бережковская наб., д. 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993, Российская Федерация тел. +7(499)240-60-15, факс +7(495)531-63-18		Уполномоченное лицо: Громова Г. Телефон № 8(495)531-64-81																		

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Номер международной заявки

PCT/RU 2022/050281

С. (Продолжение). ДОКУМЕНТЫ СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕВАЛЕНТНЫМИ		
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	RU 2698969 C2 (Ф.ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ) 02.09.2019, страницы 7, 9, 10, 21, 62, 65, примеры 1-8, формула	14, 43, 44-47, 52-57
Y	GenBank: EAX03641.1, 23.03.2015	16, 18
Y	GenBank: CDO67975.1, 17.04.2014	20, 22
Y	GenBank: AAX29951.1, 26.07.2016	20, 22, 26, 28
Y	GenBank: CAA28049.1, 25.07.2016	26, 28
Y	SCHUSTER Stephen J. Bispecific antibodies for the treatment of lymphomas: Promises and challenges. SUPPLEMENT ARTICLE, 2021, pp.113-116, реферат	48
Y	RU 2518291 C2 (ПФАЙЗЕР ВЭКСИНС ЭЛЭЛСИ) 10.06.2014, страница 25	51
A	SCHMITTNAEGEL Martina et al. A New Class of Bifunctional Major Histocompatibility Class I Antibody Fusion Molecules to Redirect CD8 T Cells. Molecular Cancer Therapeutics, 2016, 15(9), pp.2130-2142, фигура 1, реферат, Results, Discussion, Materials and Methods	1-57

Графа I Последовательность(и) нуклеотидов и/или аминокислот (Продолжение пункта 1.с первого листа)

1. Относительно любой последовательности нуклеотидов и/или аминокислот, раскрытой в международной заявке, международный поиск подготовлен на основе перечня последовательностей:
- a. ☒ в виде неотъемлемой части международной заявки в том виде, как она подана.
- b. ☐ представленного впоследствии после даты международной подачи для целей проведения международного поиска (Правило 13^{ter}.1(a)),
- ☐ сопровождающийся заявлением о том, что перечень последовательностей не выходит за рамки первоначально поданной международной заявки.
2. ☐ Относительно любой нуклеотидной и/или аминокислотной последовательности, раскрытой в международной заявке, этот отчет подготовлен в той степени, в которой полноценный поиск может быть осуществлен без перечня последовательностей в соответствии со Стандартом ВОИС ST.26.
3. Дополнительные комментарии: