



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 14/7051 (2019.08); C07K 16/00 (2019.08); C07K 16/22 (2019.08); C07K 16/244 (2019.08); C07K 16/247 (2019.08); C07K 16/2809 (2019.08); C12N 15/70 (2019.08); C12P 21/00 (2019.08); C07K 2317/14 (2019.08); C07K 2317/50 (2019.08); C07K 2317/622 (2019.08); C07K 2319/00 (2019.08)

(21)(22) Заявка: 2017119396, 05.11.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
05.11.2015

Дата регистрации:
25.12.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
05.11.2014 US 62/075,798

(43) Дата публикации заявки: 05.12.2018 Бюл. № 34

(45) Опубликовано: 25.12.2020 Бюл. № 36

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 05.06.2017

(86) Заявка РСТ:
US 2015/059342 (05.11.2015)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2016/073794 (12.05.2016)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Большая Спасская, д. 25,
строение 3, ООО "Юридическая фирма
Городисский и Партнеры"

(72) Автор(ы):

СИММОНС Лаура К. (US),
ОРОРИ Киран (US),
РЕЙЛЛИ Доротея (US),
ДЖУЛЬЯНОТТИ Джеймс (US)

(73) Патентообладатель(и):

ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WULFING C., PLUCKTHUN A.
"Correctly folded R-cell receptor fragments in
the Periplasm of Escherichia coli", J Mol Biol,
1994, Vol. 242, pp. 655-669. LEE SY "High cell-
density culture of Escherichia coli", 1996, Trends
Biotechnol, Vol. 14 (3), pp. 98-105. WO 2002/
061090 A2 08.08.2002. WO 2003/020763 A2
13.03.2003. ARBABI-GHAHROUDI M et al.
(см. прод.)

(54) СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ДВУЦЕПОЧНЫХ БЕЛКОВ В БАКТЕРИЯХ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области
иммунологии. Предложен способ получения
иммуномобилизующего моноклонального Т-
клеточного рецептора против рака (ImmTAC).

Данное изобретение может найти дальнейшее
применение в получении гетерологичных
секреторных белков в бактериях. 19 з.п. ф-лы, 88
ил., 7 табл., 8 пр.

(56) (продолжение):

"Prokaryotic expression of antibodies", Cancer Metastasis Rev, 2005, Vol. 24(4), pp. 501-519. RU 2426742 C2 20.08.2011.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 16/22 (2006.01)*C07K 16/24* (2006.01)*C07K 16/28* (2006.01)*C12N 15/63* (2006.01)*C12P 21/00* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07K 14/7051 (2019.08); *C07K 16/00* (2019.08); *C07K 16/22* (2019.08); *C07K 16/244* (2019.08); *C07K 16/247* (2019.08); *C07K 16/2809* (2019.08); *C12N 15/70* (2019.08); *C12P 21/00* (2019.08); *C07K 2317/14* (2019.08); *C07K 2317/50* (2019.08); *C07K 2317/622* (2019.08); *C07K 2319/00* (2019.08)

(21)(22) Application: **2017119396, 05.11.2015**

(24) Effective date for property rights:
05.11.2015

Registration date:
25.12.2020

Priority:

(30) Convention priority:
05.11.2014 US 62/075,798

(43) Application published: **05.12.2018 Bull. № 34**(45) Date of publication: **25.12.2020 Bull. № 36**(85) Commencement of national phase: **05.06.2017**

(86) PCT application:
US 2015/059342 (05.11.2015)

(87) PCT publication:
WO 2016/073794 (12.05.2016)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. Bolshaya Spasskaya, d. 25,
stroenie 3, OOO "Yuridicheskaya firma
Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**SIMMONS, Laura, C. (US),
AURORI, Kieran (US),
REILLY, Dorothea (US),
GIULIANOTTI, James (US)**

(73) Proprietor(s):

GENENTECH, INC. (US)

(54) METHODS FOR PRODUCING DOUBLE-STRANDED PROTEINS IN BACTERIA

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: present invention relates to immunology. Disclosed is a method for producing the immunomodulatory monoclonal T-cell receptor against cancer (ImmTAC).

EFFECT: present invention can find further application in producing heterologous secretory proteins in bacteria.

20 cl, 88 dwg, 7 tbl, 8 ex

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ(ЫЕ) ЗАЯВКУ(И)

[0001] В настоящей заявке заявляется приоритет по предварительной заявке США № 62/075798, поданной 5 ноября 2014 г., которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки.

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ТЕКСТОВОМ ФАЙЛЕ ФОРМАТА ASCII

[0002] Содержание следующего документа в текстовом ASCII-файле полностью включено посредством ссылки в: машинно-читаемой форме (CRF) списка последовательностей (имя файла: 146392035140SEQLIST.TXT, дата записи: 5 ноября 2015 г., размер: 2 KB).

Область изобретения

[0003] Настоящее изобретение относится к способам получения рекомбинантных полипептидов, таких, как белки иммунномобилизирующего моноклонального Т-клеточного рецептора против рака (ImmTAC). Конкретнее, настоящее изобретение относится к способам получения гетерологичных секреторных белков в бактериях посредством использования оптимизированных экспрессирующих векторов и процессов культивирования.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Получение рекомбинантного белка в прокариотических клетках-хозяевах является источником многих важных терапевтических агентов с момента получения инсулина человека в *E. coli* в 1978 г. По мере совершенствования молекулярно-биологических инструментов и знаний возростала сложность рекомбинантных терапевтических средств. Получение указанных рекомбинантных белков требует, чтобы продукты обладали такими свойствами, как правильная трансляция, фолдинг, сборка, формирование дисульфидных связей и транспорт в периплазму. Известно, что экспрессия многих рекомбинантных белков, особенно с дисульфидными связями (например, двуцепочечных белков, в том числе, не ограничиваясь ими, антител и фрагментов антител), приводит к образованию телец включения в прокариотических клетках-хозяевах (Spadiut et al., 32:54, 2014). Соответственно, существует потребность в системах экспрессии и процессах рекомбинантной получения надлежащим образом уложенных и собранных двуцепочечных белков в прокариотических клетках-хозяевах в промышленных масштабах.

[0005] Моноклональные антитела представляют собой один из быстро развивающихся видов рекомбинантных терапевтических агентов, причем большое количество моноклональных антител уже утверждено или рассматриваются для применения при лечении различных заболеваний (Nelson et al., Nature Review Drug Discovery, 9:767, 2010). Традиционные моноклональные антитела связывают единственный антиген-мишень. При многих заболеваниях может быть выгодным использование антител, связывающих более одного антигена-мишени, т.е. полиспецифические антитела. Такие антитела можно применять при комбинаторных подходах, направленных против нескольких терапевтических мишеней (см., например, Bostrom et al., Science 323:1610, 2009; и Wu et al., Nature Biotechnology, 25:1290, 2007). Например, можно продуцировать биспецифические антитела, одновременно связывающие эпитоп, экспрессируемый на поверхности раковых клеток, и эпитоп, экспрессируемый на Т-клетках, с целью индукции уничтожения опухолевых клеток, опосредованного Т-клетками (Shalaby et al., Clinical Immunology, 74:185, 1995).

[0006] Применение биспецифических антител в клинике требует возможности продуцировать двуцепочечные белки в промышленных количествах. Несмотря на то,

что описаны векторные компоненты, повышающие продукцию рекомбинантных белков в прокариотических клетках-хозяевах (см., например, Schlapschy et al., Protein Engineering, Design and Selection, 19:385, 2006; и Simmons et al., Journal of Immunological Methods 263: 133, 2002), описанные в настоящем документе результаты показывают, что модификации
 5 только экспрессирующих векторов не решает всех проблем с продукцией, возникающих при производстве двуцепочечных белков. Сохраняется потребность в оптимальных способах эффективной получения рекомбинантных двуцепочечных белков, например, фрагментов антител и полуантител, в препаративных масштабах.

[0007] Все упомянутые в настоящем документе источники, включая патентные заявки,
 10 патентные публикации и номера доступа UniProtKB/Swiss-Prot, полностью включены в настоящий документ посредством ссылок, как если бы каждый отдельный источник был специально и по отдельности включен посредством ссылки.

Краткое описание изобретения

[0008] В одном аспекте в настоящем документе предложены способы получения
 15 полипептида, содержащего две цепи, в прокариотической клетке-хозяине, причем указанный способ включает: (а) культивирование клетки-хозяина с целью экспрессии двух цепей полипептида, при котором после экспрессии происходит фолдинг и сборка двух цепей с образованием биологически активного полипептида в клетке-хозяине; причем клетка-хозяин содержит полинуклеотид, содержащий (1) первую единицу
 20 трансляции, кодирующую первую цепь полипептида; (2) вторую единицу трансляции, кодирующую вторую цепь полипептида; и (3) третью единицу трансляции, кодирующую по меньшей мере один шаперонный белок, выбранный из группы, состоящей из пептидил-пролил-изомераз, протеиндисульфидоксидоредуктаз и их комбинаций; причем клетку-хозяина культивируют в культуральной среде в условиях, включающих: ростовую
 25 фазу, включая ростовую температуру и ростовую скорость перемешивания, и продуктивную фазу, включая температуру получения и скорость перемешивания при получения, причем ростовая температура превышает температуру получения на 2-10°C, а ростовая скорость перемешивания превышает скорость перемешивания при получения на 50-250 об/мин; и (б) выделение биологически активного полипептида из клетки-
 30 хозяина. Также предложены способы получения иммуномобилизующего моноклонального Т-клеточного рецептора против рака (ImmTAC), содержащего альфа-цепь рецептора Т-клеток (TCR) и бета-цепь TCR в прокариотической клетке-хозяине, причем эти способы включают: (а) культивирование клетки-хозяина для экспрессии альфа-цепи TCR и бета-цепи TCR ImmTAC в культуральной среде в условиях,
 35 включающих: ростовую фазу, включая ростовую температуру и ростовую скорость перемешивания, и продуктивную фазу, включая температуру получения и скорость перемешивания при получения, при котором после экспрессии происходит фолдинг и сборка альфа-цепи TCR и бета-цепи TCR с образованием биологически активного ImmTAC в клетке-хозяине; причем клетка-хозяин содержит полинуклеотид, содержащий
 40 (1) первую единицу трансляции, кодирующую альфа-цепь TCR ImmTAC; (2) вторую единицу трансляции, кодирующую бета-цепь TCR ImmTAC; и (3) третью единицу трансляции, кодирующую по меньшей мере один шаперонный белок, выбранный из группы, состоящей из пептидил-пролил-изомераз, протеиндисульфидоксидоредуктаз и их комбинаций; причем ростовая температура превышает температуру получения на
 45 2-10°C, а ростовая скорость перемешивания превышает скорость перемешивания при получения на 50-250 об/мин; и (б) выделение биологически активного ImmTAC из клетки-хозяина. Также предложены способы получения полипептида, содержащего две цепи, в прокариотической клетке-хозяине, включающие: (а) культивирование клетки-хозяина

с целью экспрессии двух цепей полипептида, при котором после экспрессии происходит фолдинг и сборка двух цепей с образованием биологически активного полипептида в клетке-хозяине; причем клетка-хозяин содержит полинуклеотид, содержащий: (1) первую единицу трансляции, кодирующую первую цепь полипептида; (2) вторую единицу трансляции, кодирующую вторую цепь полипептида; (3) третью единицу трансляции, кодирующую первый шаперонный белок; (4) четвертую единицу трансляции, кодирующую второй шаперонный белок, и (5) пятую единицу трансляции, кодирующую третий шаперонный белок, причем первый, второй и третий шаперонные белки выбраны из группы, состоящей из пептидил-пролил-изомераз, протеиндисульфидоксидоредуктаз и их комбинаций; причем клетку-хозяина культивируют в культуральной среде в условиях, включающих: ростовую фазу, включая ростовую температуру и ростовую скорость перемешивания, и продуктивную фазу, включая температуру продукции и скорость перемешивания при продукции, причем ростовая температура превышает температуру продукции на 2-10°C, а ростовая скорость перемешивания превышает скорость перемешивания при продукции на 50-250 об/мин; и (b) выделение биологически активного полипептида из клетки-хозяина. Также предложены способы получения иммуномобилизующего моноклонального Т-клеточного рецептора против рака (ImmTAC), содержащего альфа-цепь рецептора Т-клеток (TCR) и бета-цепь TCR в прокариотической клетке-хозяине, причем эти способы включают (a) культивирование клетки-хозяина для экспрессии альфа-цепи TCR и бета-цепи TCR ImmTAC в культуральной среде в условиях, включающих: температуру при фазе роста и скорость перемешивания при фазе роста, и температуру при фазе образования продукта и скорость перемешивания при фазе образования продукта, при котором после экспрессии происходит фолдинг и сборка альфа-цепи и бета-цепи TCR с образованием биологически активного ImmTAC в клетке-хозяине; причем клетка-хозяин содержит полинуклеотид, содержащий: (1) первую единицу трансляции, кодирующую альфа-цепь TCR ImmTAC; (2) вторую единицу трансляции, кодирующую бета-цепь TCR ImmTAC; (3) третью единицу трансляции, кодирующую первый белок-шаперон; (4) четвертую единицу трансляции, кодирующую второй белок-шаперон, и (5) пятую единицу трансляции, кодирующую третий белок-шаперон, причем первый, второй и третий белки-шапероны выбраны из группы, состоящей из пептидил-пролил-изомераз, протеин-дисульфидоксидоредуктаз и их комбинаций; причем температура при фазе роста превышает температуру при фазе образования продукта на 2-10°C, и скорость перемешивания при росте превышает скорость перемешивания при фазе образования продукта на 50-250 об/мин; и (b) выделение биологически активного ImmTAC из клетки-хозяина. В некоторых вариантах реализации полипептид содержит три, четыре или пять цепей. В некоторых вариантах реализации рН культуральной среды в продуктивной фазе поддерживают в диапазоне рН между 6,7 и 7,3. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид дополнительно содержит три копии промотора, причем первая копия находится в функциональной комбинации с первой единицей трансляции, вторая копия - в функциональной комбинации со второй единицей трансляции, а третья копия - в функциональной комбинации с третьей единицей трансляции, контролируя транскрипцию первой цепи, второй цепи и шаперонного белка. В некоторых вариантах реализации две из единиц трансляции, кодирующие два из трех шаперонных белков, являются частью одиночной единицы транскрипции (бицистронной единицы). В некоторых вариантах реализации полинуклеотид дополнительно содержит промотор в функциональной комбинации с каждой единицей трансляции. В некоторых вариантах реализации промотор является индуцибельным промотором. В некоторых вариантах

реализации индуцибельный промотор является IPTG-индуцибельным промотором, контролирующим транскрипцию первой цепи, второй цепи и шаперонного белка в отсутствие индукции IPTG. В некоторых вариантах реализации индуцибельный промотор является IPTG-индуцибельным промотором, контролирующим транскрипцию альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR и шаперонного белка в отсутствие индукции IPTG. В некоторых вариантах реализации индуцибельный промотор является Pho-промотором, контролирующим транскрипцию первой цепи, второй цепи и шаперонного белка при исчерпании фосфата в культуральной среде. В некоторых вариантах реализации индуцибельный промотор является Pho-промотором, контролирующим транскрипцию альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR и шаперонного белка при исчерпании фосфата в культуральной среде. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид дополнительно содержит селективный маркер, а культуральная среда содержит селективный агент, состоящий из одиночного антибиотика, вызывающий сохранение полинуклеотида в клетке-хозяине. В некоторых вариантах реализации первая единица трансляции содержит первую область инициации трансляции (TIR) в функциональной комбинации с областью, кодирующей первую цепь, а вторая единица трансляции содержит вторую область инициации трансляции (TIR) в функциональной комбинации с областью, кодирующей вторую цепь, причем относительная интенсивность трансляции первой и второй TIR составляет от около 1,0 до около 3,0. В некоторых вариантах реализации первая единица трансляции содержит первую область инициации трансляции (TIR) в функциональной комбинации с областью, кодирующей альфа-цепь TCR, а вторая единица трансляции содержит вторую область инициации трансляции (TIR) в функциональной комбинации с областью, кодирующей бета-цепь TCR, причем относительная интенсивность трансляции первой и второй TIR составляет от около 1,0 до около 3,0. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере один шаперонный белок или первый шаперонный белок содержит пептидил-пролил-изомеразу. В некоторых вариантах реализации пептидил-пролил-изомераза представляет собой белок FkpA. В некоторых вариантах реализации белок FkpA представляет собой FkpA *E. coli*. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере один шаперонный белок дополнительно включает или один или оба из второго шаперонного белка, а третий шаперонный белок включает протеин-дисульфид-оксидоредуктазу. В некоторых вариантах реализации протеин-дисульфид-оксидоредуктаза представляет собой один или оба из белка DsbA и белка DsbC. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одна протеин-дисульфид-оксидоредуктаза представляет собой один или оба из DsbA *E. coli* и DsbC *E. coli*. В некоторых вариантах реализации прокариотическая клетка-хозяин является грамотрицательной бактерией. В некоторых вариантах реализации грамотрицательная бактерия представляет собой *E. coli*. В некоторых вариантах реализации *E. coli* принадлежит к штамму, дефицитному по эндогенной протеазной активности. В некоторых вариантах реализации *E. coli* принадлежит к штамму с мутацией *degPS210A*. В некоторых вариантах реализации *E. coli* представляет собой штамм с генотипом W3110 $\Delta fhuA \Delta phoA ilvG2096 (Val^f) \Delta prc spr43H1 \Delta degP \Delta manA lacI^Q \Delta ompT \Delta menE degPS210A$. В некоторых вариантах реализации полипептид является гетерологичным для клетки-хозяина. В некоторых вариантах реализации полипептид является мономером или гетеродимером (например, биспецифическим антителом). В некоторых вариантах реализации альфа-цепь TCR содержит вариабельный домен альфа-цепи TCR и константный домен альфа-цепи TCR, а бета-цепь TCR содержит вариабельный домен бета-цепи TCR и константный домен бета-цепи TCR. В некоторых вариантах реализации две цепи полипептида связаны друг с другом по меньшей мере одной дисульфидной

связью. В некоторых вариантах реализации две цепи ImmTAC связаны друг с другом по меньшей мере одной дисульфидной связью. В некоторых вариантах реализации ImmTAC дополнительно содержит фрагмент антитела, который связывает Т-клетку и активирует ответ Т-клетки. В некоторых вариантах реализации фрагмент антитела включает фрагмент одноцепочечного антитела против CD3. В некоторых вариантах реализации ImmTAC содержит TCR, модифицированный так, чтобы обладать повышенным сродством к антигену, по сравнению со сродством к антигену TCR, который не был модифицирован. В некоторых вариантах реализации две цепи полипептида связаны друг с другом полипептидным линкером. В некоторых вариантах реализации полипептид представляет собой одновалентное антитело, причем первая цепь и вторая цепь содержат тяжелую цепь иммуноглобулина и легкую цепь иммуноглобулина. В некоторых вариантах реализации тяжелая цепь иммуноглобулина представляет собой изотип IgG1 или IgG4. В некоторых вариантах реализации одновалентное антитело способно специфически связывать антиген. В некоторых вариантах реализации антиген представляет собой цитокин. В некоторых вариантах реализации цитокин выбран из группы, состоящей из хемокина, интерферона, интерлейкина, лимфокина и фактора некроза опухоли. В некоторых вариантах реализации фактор роста представляет собой фактор роста эндотелия сосудов. В некоторых вариантах реализации антиген выбран из группы, состоящей из ИЛ-4, ИЛ-13, ИЛ-14, ИЛ-17, VEGFA и VEGFC. В некоторых вариантах реализации полипептид представляет собой секреторный белок, выделенный из периплазмы клетки-хозяина. В некоторых вариантах реализации ImmTAC выделяют из периплазмы клетки-хозяина. В некоторых вариантах реализации полипептид представляет собой иммуномобилизующий моноклональный Т-клеточный рецептор против рака (ImmTAC), содержащий растворимый Т-клеточный рецептор с повышенным сродством, слитый с одноцепочечным вариабельным фрагментом (scFv) против CD3. В некоторых вариантах реализации температура при фазе роста находится в диапазоне от около 30°C до около 34°C в течение фазы роста, и температура при фазе образования продукта находится в диапазоне от около 25°C до около 29°C в течение фазы образования продукта. В некоторых вариантах реализации скорость перемешивания при росте находится в диапазоне от около 600 до 800 об/мин в течение фазы роста, и скорость перемешивания при фазе образования продукта находится в диапазоне от около 300 до около 500 об/мин в течение фазы образования продукта. В некоторых вариантах реализации скорость перемешивания при росте достаточна для достижения скорости поглощения кислорода клеткой-хозяином в течение фазы роста, превышающей пиковую скорость поглощения кислорода клеткой-хозяином в течение фазы образования продукта на 0,5-2,5 ммоль/л/мин. В некоторых вариантах реализации пиковая скорость поглощения кислорода клеткой-хозяином в течение фазы роста находится в диапазоне от 3,5 до 4,5 ммоль/л/мин, и скорость поглощения кислорода клеткой-хозяином в течение фазы образования продукта находится в диапазоне от 1,0 до 3,0 ммоль/л/мин. В некоторых вариантах реализации скорость перемешивания при росте превышает скорость перемешивания при фазе образования продукта на около 10-40% (об/мин/об/мин).

[0009] Следует понимать, что одно из, некоторые или все свойства различных вариантов реализации, описанные в настоящем документе, можно объединить с другим вариантом реализации настоящего изобретения. Эти и другие аспекты настоящего изобретения будут очевидны для специалиста в данной области техники. Эти и другие варианты реализации настоящего изобретения подробно описаны далее.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0010] На фиг. 1А-С показано получение общих субъединиц легкой цепи (LC) и тяжелой цепи (НС) с использованием вектора для продукции для получения полуантитела (пАт) xIL13. На фиг. 1А приведен график общих субъединиц LC и НС, полученных с использованием векторов для продукции TIR1,1 (черные столбики) и TIR2,2 (полосатые столбики), согласно измерению с помощью ОФ-ВЭЖХ. На фиг. 1В приведен график общих субъединиц LC и НС (черные столбики) или растворимых LC и НС (серые столбики), полученных с использованием продуцирующих векторов TIR1,1. На фиг. 1С приведен график общих субъединиц LC и НС (черные столбики) или растворимых LC и НС (серые столбики), полученных с использованием продуцирующих векторов TIR2,2.

[0011] На фиг. 2 показан титр пАт xIL13, полученного с использованием продуцирующих векторов TIR1,1 (черный столбик) или TIR2,2 (полосатый столбик), согласно измерению с помощью двухколоночной ОФ-ВЭЖХ.

[0012] На фиг. 3А-В показан фолдинг и сборка белков в бактериальных клетках-хозяевах. На фиг. 3А представляет собой схему с описанием получения белка в бактериях, на которой показаны фолдинг и сборка белков в периплазме с помощью шаперонов. На фиг. 3В представляет собой список белков-шаперонов, в том числе пептидил-пролил-изомераз («ППИаз»), оксидоредуктаз и других шаперонов.

[0013] На фиг. 4А показана совместимая система, используемая для скрининга вариантов FкрА. На фиг. 4В показано получение одиночной плазмиды xIL13 (pxIL13.2.2. FкрAc13), кодирующей LC, НС антитела и FкрА.

[0014] На фиг. 5А-В показано получение пАт IgG1 xVEGF после титрования экспрессии FкрА. На фиг. 5А изображен вестерн-блот, на котором показано накопление пАт и растворимой мономерной тяжелой цепи после экспрессии различных уровней FкрА, и на геле, окрашенном кумасси, показано получение общего растворимого белка при каждых условиях. На фиг. 5В представляет собой график, на котором показан титр пАт, полученный после экспрессии различных уровней FкрА.

[0015] На фиг. 6А-В показано получение пАт IgG4 xIL13 после экспрессии различных уровней FкрА. На фиг. 6А представлен график, на котором показан титр пАт xIL13, полученного с использованием различных векторных систем, сопровождаемый вестерн-блотом, на котором показано накопление пАт и растворимой мономерной тяжелой цепи при каждых условиях. На фиг. 6В представлен график, на котором показано количество FкрА, полученного с использованием различных векторных систем, сопровождаемый вестерн-блотом, на котором показана экспрессия FкрА при каждых условиях. На обоих графиках «эндогенные уровни FкрА» относятся к бактериальной клетке-хозяину, не содержащей плазмиды, кодирующей FкрА; «совместимые уровни FкрА» относятся к экспрессии xIL13 и FкрА с отдельных (совместимых) плазмид; и «одиночные уровни FкрА» относятся к одиночному вектору, экспрессирующему как xIL13, так и FкрА.

[0016] На фиг. 7А-В показана продукция пАт IgG4 xIL4 после индуцибельной экспрессии FкрА. На фиг. 7А изображен вестерн-блот, на котором показано накопление пАт и растворимой мономерной тяжелой цепи. На фиг. 7В представлен график, на котором показан титр пАт xIL4, полученного с использованием индуцибельной экспрессии FкрА, сопровождаемый вестерн-блотом, на котором показана экспрессия FкрА. На обоих графиках образец 1 использует вектор TIR1,1 для продукции пАт xIL4 и не сверхэкспрессирует FкрА; образец 2 использует вектор TIR2,2 вектора для продукции пАт xIL4 и не сверхэкспрессирует FкрА; образец 3 использует TIR1,1 для продукции пАт xIL4 и IPTG для индукции экспрессии FкрА; и образец 4 использует TIR2,2 для продукции пАт xIL4 и IPTG для индукции экспрессии FкрА.

[0017] На фиг. 8А-С показана продукция пАт IgG1 xVEGFC после экспрессии FkpA. На фиг. 8А представлен график, на котором показан титр пАт xVEGFC, полученного с использованием различных векторных систем. На фиг. 8В изображен гель, на котором показана продукция общего растворимого белка при обоих условиях с отмеченными полосами FkpA. На фиг. 8С изображен вестерн-блот, на котором показано накопление пАт xVEGFC и растворимой мономерной тяжелой цепи. На всех графиках образец 1 использует вектор TIR2,2 для продукции пАт xVEGFC и не содержит плазмиды для экспрессии FkpA; образец 2 использует вектор TIR2,2 для продукции пАт xIL4 и IPTG для индукции экспрессии FkpA.

[0018] На фиг. 9 показана система совместимых плазмид, в которой первая плазида используется для экспрессии пАт xIL13 (pxIL13.2.2. FkpAc13), и вторая плазида - для экспрессии DsbA и DsbC (pJJ247).

[0019] На фиг. 10 представлен график, на котором показана продукция пАт xIL13 со временем с использованием продуцирующей плазмиды xIL13.2.2. FkpAc13 и совместимой плазмиды для экспрессии DsbA и DsbC, с индукцией спомощью IPTG и без нее.

[0020] На фиг. 11А показана система совместимых плазмид для продукции пАт xIL14. На фиг. 11В показано получение одиночной плазмиды, кодирующей LC и HC пАт xIL14, FkpA, DsbA и DsbC.

[0021] На фиг. 12А-В показана продукция пАт xIL4 с использованием вектора TIR1,1 или TIR2,2 в отсутствие экспрессии FkpA, DsbA и DsbC (отмечено цифрами 1 и 2); в присутствии IPTG-индуцированной экспрессии FkpA (отмечено цифрами 3 и 4); и в присутствии плазмиды с FkpA, DsbA и DsbC в отсутствие IPTG (отмечено цифрами 5 и 6). На фиг. 12А изображен вестерн-блот, на котором показано накопление пАт xIL4 и растворимой мономерной тяжелой цепи в различных условиях. На фиг. 12В представлен график, на котором показан титр пАт xIL4, полученного в различных условиях, сопровождаемый вестерн-блотом, на котором показана экспрессия FkpA.

[0022] На фиг. 13 показана продукция пАт xVEGFC с использованием вектора TIR2,2 в отсутствие экспрессии FkpA, DsbA и DsbC (столбец 1); в присутствии IPTG-индуцированной экспрессии FkpA (столбец 2); и в присутствии плазмиды с FkpA, DsbA и DsbC в отсутствие IPTG (столбец 3).

[0023] На фиг. 14 показана продукция пАт xVEGFA IgG1 с использованием вектора TIR1,1 или TIR2,2 в отсутствие экспрессии FkpA, DsbA и DsbC (отмечено цифрами 1 и 3); и в присутствии плазмиды с FkpA, DsbA и DsbC в отсутствие IPTG (отмечено цифрами 2 и 4).

[0024] На фиг. 15 показана продукция пАт xIL4 с использованием вектора TIR2,2 при экспрессии FkpA, DsbA и DsbC с одного и того же вектора («Одиночный») и при экспрессии FkpA, DsbA и DsbC со второго совместимого вектора («Совместимый»), и также отрицательный контроль без вектора, экспрессирующего антитело, и без сверхэкспрессии DsbA, DsbC и FkpA («Контроль»). Вестерн-блот продемонстрировал экспрессию DsbA, DsbC и FkpA.

[0025] На фиг. 16А показана система совместимых плазмид xIL13, использующая ранее описанную продуцирующую плазмиду pxIL13.2.2. FkpAc13 и совместимую оксидоредуктазную плазмиду (pJJ247). На фиг. 16В показано получение одиночной плазмиды (MD157), кодирующей открытые рамки считывания (ОРС) pxIL13.2.2. FkpAc13 и pJJ247.

[0026] На фиг. 17 показана продукция пАт xIL13 со временем с использованием вектора TIR2,2 при экспрессии FkpA, DsbA и DsbC с одного и того же вектора («Одиночный») и при экспрессии DsbA и DsbC с совместимого вектора, и FkpA - с вектора xIL13.2.2.

ФкрАс13 («Совместимый»). Эти векторы используют промотор *rhoA* для контроля экспрессии ФкрА.

[0027] На фиг. 18 показана средняя скорость поглощения кислорода (OUR) со временем культурами, выращенными при фиксированной скорости перемешивания клеток, несущих два вектора: вектор TIR2,2, экспрессирующий пАт xIL13 и ФкрА, и вектор, экспрессирующий DsbA и DsbC под контролем IPTG-индуцибельного промотора. OUR показана для культур, выращенных в присутствии или в отсутствие IPTG. Представлено количество образцов, используемых при каждом условии («N»).

[0028] На фиг. 19 показана средняя осмоляльность в культурах, выращенных при фиксированной скорости перемешивания клеток, несущих два вектора: вектор TIR2,2, экспрессирующий пАт xIL13 и ФкрА, и вектор, экспрессирующий DsbA и DsbC под контролем IPTG-индуцибельного промотора. Осмоляльность показана для культур, выращенных в присутствии или в отсутствие IPTG. Представлено количество образцов, используемых при каждом условии («N»).

[0029] На фиг. 20 показан средний титр пАт xIL13, полученного со временем в клетках, несущих два вектора: вектор TIR2,2, экспрессирующий пАт xIL13 и ФкрА, и вектор, экспрессирующий DsbA и DsbC под контролем IPTG-индуцибельного промотора. Титр полученного антитела показан для культур, выращенных в присутствии или в отсутствие IPTG. Представлено количество образцов, используемых при каждом условии («N»).

[0030] На фиг. 21 показана средняя OUR со временем в культурах, выращенных при скорости перемешивания 650 об/мин в течение 26 часов с последующим переключением на более низкую скорость перемешивания, достаточную для достижения отмеченного заданного значения OUR. Клетки несли два вектора: вектор TIR2,2, экспрессирующий пАт xIL13 и ФкрА, и вектор, экспрессирующий DsbA и DsbC в отсутствие IPTG.

Представлено количество образцов, используемых при каждом условии («N»).

[0031] На фиг. 22 показана средняя осмоляльность со временем в культурах, выращенных при скорости перемешивания 650 об/мин в течение 26 часов с последующим переключением на более низкую скорость перемешивания, достаточную для достижения отмеченного заданного значения OUR. Клетки несли два вектора: вектор TIR2,2, экспрессирующий пАт xIL13 и ФкрА, и вектор, экспрессирующий DsbA и DsbC в отсутствие IPTG. Представлено количество образцов, используемых при каждом условии («N»).

[0032] На фиг. 23 показан средний титр продукции пАт xIL13 в два момента времени (54 и 72 часа) в культурах, выращенных при скорости перемешивания 650 об/мин в течение 26 часов с последующим переключением на более низкую скорость перемешивания, достаточную для достижения отмеченного заданного значения OUR. Клетки несли два вектора: вектор TIR2,2, экспрессирующий пАт xIL13 и ФкрА, и вектор, экспрессирующий DsbA и DsbC в отсутствие IPTG. Представлено количество образцов, используемых при каждом условии («N»).

[0033] На фиг. 24 показана средняя плотность клеток ($OP_{550\text{ нм}}$) со временем в культурах, продуцирующих пАт xIL13 с вектора TIR2,2, который также кодирует ФкрА под контролем промотора *rhoA* и DsbA и DsbC под контролем промотора *tacII* в отсутствие IPTG. Культуры выращивали при постоянной температуре как в фазе роста, так и в фазе образования продукта (Tg/Tr), равной 28°C или 30°C. Изменение скорости перемешивания при ферментации выполняли через 26 часов. Представлено количество образцов, используемых при каждом условии («N»).

[0034] На фиг. 25 показана средняя OUR со временем в культурах клеток, продуцирующих пАт xIL13 с вектора TIR2,2, который также кодирует ФкрА под

контролем промотора *rhoA* и *DsbA* и *DsbC* под контролем промотора *tacII* в отсутствие IPTG. Культуры выращивали при постоянной температуре как в фазе роста, так и в фазе образования продукта (Tg/Tr), равной 28°C или 30°C. Представлено количество образцов, используемых при каждом условии («N»).

5 [0035] На фиг. 26 показана средняя концентрация фосфата со временем в культурах клеток, продуцирующих пАт xIL13 с вектора TIR2,2, который также кодирует FkpA под контролем промотора *rhoA* и *DsbA* и *DsbC*, под контролем промотора *tacII* в отсутствие IPTG. Культуры выращивали при постоянной температуре как в фазе роста, так и в фазе образования продукта (Tg/Tr), равной 28°C или 30°C. Представлено
10 количество образцов, используемых при каждом условии («N»).

[0036] На фиг. 27 показан средний титр пАт xIL13, полученного в культурах клеток с вектора TIR2,2, который также кодирует FkpA под контролем промотора *rhoA* и *DsbA* и *DsbC* под контролем промотора *tacII* в отсутствие IPTG. Культуры выращивали при постоянной температуре как в фазе роста, так и в фазе образования продукта (Tg/Tr),
15 равной 28°C или 30°C.

[0037] На фиг. 28 показана средняя плотность клеток (ОП_{550 нм}) со временем в культурах, продуцирующих пАт xIL13 с вектора TIR2,2, который также кодирует FkpA под контролем промотора *rhoA* и *DsbA* и *DsbC* под контролем промотора *tacII* в отсутствие IPTG. Культуры выращивали при постоянной температуре 28°C или 30°C
20 (Tg/Tr 28°C или Tg/Tr 30°C, соответственно), или выращивали при 30°C в течение ростовой фазы, а затем меняли температуру на 28°C для продуктивной фазы (Tg 30 Tr 28). Представлено количество образцов, используемых при каждом условии («N»).

[0038] На фиг. 29 показана средняя концентрация фосфата со временем в культурах клеток, продуцирующих пАт xIL13 с вектора TIR2,2, который также кодирует FkpA
25 под контролем промотора *rhoA* и *DsbA* и *DsbC*, под контролем промотора *tacII* в отсутствие IPTG. Культуры выращивали при постоянной температуре 28°C или 30°C (Tg/Tr 28°C или Tg/Tr 30°C, соответственно), или выращивали при 30°C в течение фазы роста, и затем меняли температуру на 28°C для фазы образования продукта (Tg 30 Tr). Представлено количество образцов, используемых при каждом условии («N»).

30 [0039] На фиг. 30 показана OUR со временем в культурах клеток, продуцирующих пАт xIL13 с вектора TIR2,2, который также кодирует FkpA под контролем промотора *rhoA* и *DsbA* и *DsbC* под контролем промотора *tacII* в отсутствие IPTG. Культуры выращивали при постоянной температуре 28°C или 30°C (Tg/Tr 28°C или Tg/Tr 30 °C, соответственно), или выращивали при 30°C в течение фазы роста, и затем меняли
35 температуру на 28°C для фазы образования продукта (Tg 30 Tr 28). Представлено количество образцов, используемых при каждом условии («N»).

[0040] На фиг. 31 показан средний титр пАт xIL13, полученного со временем с вектора TIR2,2, который также кодирует FkpA под контролем промотора *rhoA* и *DsbA* и *DsbC* под контролем промотора *tacII* в отсутствие IPTG. Культуры выращивали при
40 постоянной температуре 28°C или 30°C, как отмечено (Tg/Tr 28°C или Tg/Tr 30°C, соответственно), или выращивали при 30°C в течение фазы роста, и затем меняли температуру на 28°C для фазы образования продукта (Tg 30 Tr 28).

[0041] На фиг. 32 представлены результаты планирования частичного факторного эксперимента (DoE) - анализ титра пАт xIL13 с одиночной плазмиды (MD157) при
45 различных условиях, соответствующих коду в прилагаемой таблице.

[0042] На фиг. 33 показан титр пАт xIL4, полученного с вектора TIR2,2, который также кодирует FkpA, *DsbA* и *DsbC* под контролем промотора *tacII* в отсутствие IPTG. Культуры выращивали при постоянной температуре 30°C (Tg/Tr 30°C, соответственно),

или выращивали при 34°C в течение фазы роста, и затем меняли температуру на 25°C для фазы образования продукта (Tg 34 Tr 25).

[0043] На фиг. 34 представлены результаты планирования частичного факторного эксперимента (DoE) - анализ титра пАт xIL17 с одиночной плазмиды (MD341) при различных условиях, соответствующих коду в прилагаемой таблице.

[0044] На фиг. 35 показано влияние совместной экспрессии первого оптимизирующего белка-шаперона с последующей оптимизацией этапов процесса (например, скорости перемешивания, Tg и Tr) на титр пАт xIL13.

[0045] На фиг. 36А показан титр растворимого пАт xIL13 при ферментациях, выполненных в штаммах-хозяевах 66F8 и 67А6. На фиг. 36В показаны общие концентрации легкой и тяжелой цепи xIL13 через 72 часа в штаммах-хозяевах 66F8 и 67А6. N=2 для обоих условий.

[0046] На фиг. 37А показан титр растворимого пАт xIL4 при ферментациях, выполненных в штаммах-хозяевах 66F8 и 67А6 при постоянной температуре ферментации. На фиг. 37В показан общий титр растворимого пАт xIL4 при ферментациях, выполненных в штаммах-хозяевах 66F8 и 67А6 при условиях ферментации, включающих смену температуры. N=2 для обоих условий.

[0047] На фиг. 38А показан титр легкой цепи xIL4, и на фиг. 38В показан титр тяжелой цепи xIL4 при ферментациях, выполненных в штаммах-хозяевах 66F8 и 67А6 при условиях ферментации, включающих смену температуры. N=2 для обоих условий.

[0048] На фиг. 39 представлена карта плазмиды для секреции пАт xIL33. Открытые рамки считывания LC и HC размещены независимо друг от друга в функциональной комбинации с TIR2.

[0049] На фиг. 40 показано накопление пАт xIL33 при ферментациях, выполненных при отсутствии совместной экспрессии шаперонов DsbA, DSBC, FkpA при постоянной температуре 30°C (базовый вариант), и при ферментациях, выполненных в присутствии совместной экспрессии шаперонов DsbA, DSBC и FkpA при аналогичных условиях процесса (с шаперонами).

[0050] На фиг. 41 показаны отличия титра пАт aIL33 от модели эксперимента (DoE), выполненной с использованием одиночной плазмиды пАт xIL33, содержащей шапероны FkpA, DsbA, DSBC. Факторы DoE включали pH, температуру при фазе роста (Tg), температуру при фазе образования продукта (Tr) и целевую скорость поглощения кислорода (OUR) в фазе образования продукта.

[0051] На фиг. 42 приведена нуклеотидная последовательность вариантов сигнальной последовательности FkpA TIR1 (SEQ ID NO: 1), TIR2 (SEQ ID NO: 2) и TIR3 (SEQ ID NO: 3). В третьем положении специфических кодонов были внесены одиночные нуклеотидные замены, представляющие собой синонимичные замены кодонов, не меняющие аминокислотную последовательность сигнального пептида FkpA (SEQ ID NO: 45).

[0052] На фиг. 43 показано количество вариантов TIR FkpA по сравнению с вариантом TIR1 FkpA (плазмида 19).

[0053] На фиг. 44 показано накопление пАт xIL13 в ферментациях, выполненных с использованием вариантов TIR FkpA TIR1, TIR2 и TIR3. Титр, полученный при каждом условии, составлял 1,5, 2,5 и 4,0 г/л для вариантов TIR1, TIR2 и TIR3, соответственно.

[0054] На фиг. 45 показано накопление пАт xIL13 в ферментациях, выполненных с использованием вариантов TIR FkpA TIR1, TIR2 и TIR3.

[0055] На фиг. 46 показан график накопления пАт xIL17 в ферментациях, выполненных с использованием вариантов FkpA TIR1, TIR2 и TIR3.

[0056] На фиг. 47А показан график накопления пАт xIL13 в ферментациях,

выполненных с использованием вариантов TIR FкрА. **На фиг. 47В** показан уровень FкрА в растворимой фракции, полученной в конце ферментации пАт xIL13.

[0057] **На фиг. 48А** показана скорость поглощения кислорода (OUR) при измененной скорости переноса кислорода (OTR) и контрольных условиях ферментации. При измененной OTR и контрольной ферментации достигались аналогичные пики OUR, составляющие около 5 ммоль/л/мин, и аналогичные целевые OUR после изменения температуры, составляющие 2,75 ммоль/л/мин. **48В** показаны профили при фазе роста при измененной OTR и контрольных условиях ферментации. При измененной OTR и контрольной ферментации получены аналогичные профили при фазе роста, оба достигнутые пика ОП₅₅₀ составили 250. Оптимальные контрольные (Ctrl) условия пАт xIL13=противодавление (BP) 1 бар, 20 стандартных литров в минуту (с. л/мин), изменение скорости перемешивания с 650 до 475 об/мин. Измененные условия OTR пАт XIL13=противодавление 0,3 бар, 13 с. л/мин, изменение скорости перемешивания с 880 до 650 об/мин.

[0058] **На фиг. 49** показаны профили накопления пАт xIL13 при измененной OTR и контрольных условиях. При измененных и контрольных условиях получены аналогичные профили накопления в процессе ферментации, оба достигнутые максимальные средние титры на момент 72 часов составили 4,1 и 4,2 г/л, соответственно.

[0059] **На фиг. 50А-50В** изображена конфигурация плазмиды, плазмиды для получения TIR1,1 ImmTAC 1 (**На фиг. 50А**), наряду с описанием TIR1,1 (**На фиг. 50В**).

[0060] **На фиг. 51** проиллюстрирован оригинальный (т.е. неоптимизированный) процесс ферментации, используемый для получения ImmTAC.

[0061] **На фиг. 52** представлено количество собранных ImmTAC и общее количество альфа- и бета-субъединиц, накопленных в конце процесса ферментации.

[0062] **На фиг. 53** представлены карты плазмиды, продуцирующей ImmTAC, и совместимой плазмиды, содержащей ORF FкрА, под контролем tac-промотора.

[0063] **На фиг. 54А** показаны растворимые и растворимые восстановленные анти-альфа- и анти-бета-вестерн-блоты при следующих условиях: без шаперонов (TIR1,1), с FкрА (+ FкрА), отрицательный контроль (-) и ImmTAC 1 позитивный контроль (ImmTAC DP). Стрелка обозначает собранный ImmTас. **На фиг. 54В** представлены окончательные титры только для TIR1,1 и TIR1,1 с условиями FкрА.

[0064] **На фиг. 55** проиллюстрированы улучшенные условия процесса ферментации, используемые для получения ImmTAC.

[0065] **На фиг. 56А-56В** показаны растворимые и растворимые восстановленные анти-альфа (**на фиг. 56А**) и анти-бета (**на фиг. 56В**) вестерн-блоты для следующих условий: без шаперонов (TIR1,1), с FкрА (+ FкрА), с FкрА и новыми условиями процесса (новые условия процесса+FкрА), отрицательный контроль (-) и положительный контроль ImmTAC 1 (ImmTAC DP).

[0066] **На фиг. 57** представлен окончательный титр для следующих условий: TIR1,1; TIR1,1 с FкрА; и TIR1,1 с FкрА и новые условия процесса.

[0067] **На фиг. 58** представлено конструирование единственной плазмиды, которая содержит ОРС альфа-цепи ImmTAC и бета-цепи, и ОРС FкрА под контролем промотора rhoA.

[0068] **На фиг. 59А** показан окончательный титр ImmTAC 1 для TIR1,1; TIR1,2; и одиночных плазмид TIR2,3, которые содержат ОРС FкрА. **На фиг. 59В** показано накопление конечных субъединиц как альфа, так и бета цепей ImmTAC для TIR1,1; TIR1,2; и одиночных плазмид TIR2,3, которые содержат ОРС FкрА.

[0069] **На фиг. 60А** показан вестерн-блоттинг для FкрА от ферментаций, выполняемых

с плазмидой, продуцирующей ImmTAC TIR1,1 и совместимой плазмидой FkpA, и единственной плазмидой TIR1,1, содержащей OPC FkpA. На фиг. 60B показан окончательный титр для следующих условий: только TIR1,1; TIR1,1 с FkpA; TIR1,1 совместимая плазмидная система FkpA; и единичная плазмидная система TIR1,1 FkpA.

5 [0070] На фиг. 61 показаны карты плазмид продуцирующей плазмиды ImmTAC, содержащей OPC FkpA, альфа-цепи и бета-цепи, и совместимую плазмиду, содержащую оксидоредуктазу (например, DsbC) под контролем tac-промотора.

[0071] На фиг. 62 показан окончательный титр ферментаций, выполненных с единичной плазмидой TIR1,1, которая содержит OPC FkpA с совместимыми плазмидами, которые
10 содержат OPC(ы) DsbA отдельно, только DsbC или DsbA и DsbC вместе взятые.

[0072] На фиг. 63 показан окончательный титр от ферментаций, проведенных с единственной одиночной плазмидой TIR1,1; единственной плазмидой TIR1.1 с DsbC-совместимой плазмидой; и единственной плазмидой TIR2,3 с DsbC-совместимой плазмидой.

15 [0073] На фиг. 64 показано кумулятивное увеличение конечного титра с использованием вышеупомянутых оптимизаций от исходной плазмиды TIR1,1 до одиночной плазмиды TIR2,3 с DsbC-совместимой плазмидой.

[0074] На фиг. 65A-65B показана молекула ImmTAC 2, протестированная с производственной плазмидой TIR2,3, с и без совместимой плазмиды FkpA; и как
20 отдельная плазида TIR1,1 и TIR2,3, содержащая OPC FkpA; и в виде одной плазмиды TIR1,1 и TIR2,3, содержащей OPC FkpA с совместимой плазмидой DsbC. Представлены вестерн-блоты, показывающие получение альфа (на фиг. 65A) и бета (на фиг. 65B) цепей.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0075] Примеры, представленные в настоящем документе, демонстрируют, что
25 совместная экспрессия одного или более из специфических шаперонных белков в комбинации с единицами трансляции, кодирующими каждую цепь многоцепочечного белка (например, легкую цепь и тяжелую цепь полуантитела) увеличивает производство собранного многоцепочечного белка в системе прокариотической клетки-хозяина. Кроме того, примеры демонстрируют, что последующие
30 усовершенствования процесса, например, специфические температуры и скорости перемешивания для определенных фаз ферментации, приводят к значительному улучшению продукции и надежности без усовершенствования вектора для экспрессии. В целом, способы, описанные в настоящем документе, позволяют достичь по меньшей мере 10-кратного прироста продукции типичных двуцепочечных полипептидов
35 (например, полуантитела).

[0076] В одном аспекте в настоящем документе предложены способы получения полипептида, содержащего две цепи, в прокариотической клетке-хозяине, посредством культивирования клетки-хозяина с целью экспрессии двух цепей полипептида, при котором после экспрессии происходит фолдинг и сборка двух цепей с образованием
40 биологически активного полипептида в клетке-хозяине; причем клетка-хозяин содержит полинуклеотид, содержащий (1) первую единицу трансляции, кодирующую первую цепь полипептида; (2) вторую единицу трансляции, кодирующую вторую цепь полипептида; и (3) третью единицу трансляции, кодирующую по меньшей мере один белок-шаперон, выбранный из пептидил-пролил-изомераз, протеин-дисульфид-оксидоредуктаз и их
45 комбинаций; причем клетку-хозяина культивируют в культуральной среде в условиях, предусматривающих: температуру при фазе роста и скорость перемешивания при фазе роста, и температуру при фазе образования продукта и скорость перемешивания при фазе образования продукта, причем температура при фазе роста превышает температуру

при фазе образования продукта на 2-10°C, и скорость перемешивания при росте превышает скорость перемешивания при фазе образования продукта на 50-250 об/мин; и (b) выделение биологически активного полипептида из клетки-хозяина. В одном аспекте указанный полипептид состоит из двух цепей, в то время как в еще одном

5 аспекте полипептид содержит три, четыре, пять или более цепей.

[0077] В еще одном аспекте в настоящем документе предложены способы получения полипептида, содержащего две цепи, в прокариотической клетке-хозяине, посредством культивирования клетки-хозяина с целью экспрессии двух цепей полипептида, при котором после экспрессии происходит фолдинг и сборка двух цепей с образованием

10 биологически активного полипептида в клетке-хозяине; причем клетка-хозяин содержит полинуклеотид, содержащий (1) первую единицу трансляции, кодирующую первую цепь полипептида; (2) вторую единицу трансляции, кодирующую вторую цепь полипептида; (3) третью единицу трансляции, кодирующую первый белок-шаперон; (4) четвертую единицу трансляции, кодирующую второй белок-шаперон; и (5) пятую единицу

15 трансляции, кодирующую третий белок-шаперон, где первый, второй и третий белки-шапероны выбраны из пептидил-пролил-изомераз, протеин-дисульфид-оксидоредуктаз и их комбинаций; причем клетку-хозяина культивируют в культуральной среде в условиях, предусматривающих: температуру при фазе роста и скорость перемешивания при фазе роста, и температуру при фазе образования продукта и скорость

20 перемешивания при фазе образования продукта, причем температура при фазе роста превышает температуру при фазе образования продукта на 2-10°C, и скорость перемешивания при росте превышает скорость перемешивания при фазе образования продукта на 50-250 об/мин; и (b) выделение биологически активного полипептида из клетки-хозяина. В одном аспекте указанный полипептид состоит из двух цепей, в то

25 время как в еще одном аспекте полипептид содержит три, четыре, пять или более цепей.

I. Определения

[0078] Перед подробным описанием настоящего изобретения следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными композициями или биологическими системами, которые, разумеется, могут различаться. Также следует

30 понимать, что терминология, применяемая в настоящем документе, предназначена только для описания конкретных вариантов реализации изобретения и не предназначена для ограничения.

[0079] Как используется в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают множественное число, если смысл описания не

35 указывает на иное явным образом. Так, например, упоминание «молекулы» необязательно включает комбинацию двух или более таких молекул, и т.д.

[0080] В данном контексте термин «около» относится к обычному диапазону ошибок для соответствующего значения, хорошо известному специалисту в данной области техники. Упоминание термина «около» при значении или параметре в настоящем

40 документе включает (и описывает) варианты реализации, направленные на само это значение или параметр. Термин «около» в настоящем документе, упоминаемый со ссылкой на значение, максимально включает от 90% до 110% от указанного значения (например, относительная эффективность трансляции первой и второй TIR, составляющая от около 1,0 до около 3,0, относится к относительной эффективности

45 трансляции в диапазоне от 0,9 до 3,3).

[0081] Следует понимать, что аспекты и варианты реализации изобретения, описанные в настоящем документе, включают «содержащие», «состоящие» и/или «состоящие главным образом из» аспекты и варианты реализации.

[0082] Термин «полипептид, содержащий две цепи» (кроме того, в настоящем документе могут на равных основаниях использоваться термины «двуцепочечный белок» и «двуцепочечный полипептид») в настоящем документе предназначается для обозначения любого полипептида, содержащего более одной отдельной полипептидной цепи. В некоторых вариантах реализации двуцепочечный белок может содержать макромолекулярный комплекс из двух или более полипептидов, связанных друг с другом одной или более межмолекулярными связями, включая, без ограничения, дисульфидную связь. В некоторых вариантах реализации двуцепочечный белок может включать единый полипептид с аминокислотными последовательностями, принадлежащими двум отдельным полипептидным цепям (например, тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела), соединенным полипептидным линкером. В этом случае двуцепочечный белок может физически представлять собой одиночную цепь, но две или более из частей одиночной цепи функционально могут вести себя как две отдельные белковые цепи. Например, одноцепочечное антитело может содержать функциональную тяжелую цепь и функциональную легкую цепь, соединенные полипептидным линкером, и при этом подвергающиеся фолдингу и сборке, как если бы они представляли собой отдельные полипептиды, связанные только межмолекулярными связями (например, одной или более дисульфидными связями).

[0083] Подразумевается, что термин «вектор» в настоящем документе относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой он связан. Один из типов вектора представляет собой «плазмиду», которая относится к циклической двуцепочечной петле ДНК, в которую можно лигировать дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является фаговый вектор. Другим типом вектора является вирусный вектор, причем дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую их вводят (например, бактериальные векторы, содержащие бактериальный сайт инициации репликации, и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) можно встроить в геном клетки-хозяина после введения в клетку-хозяина и, таким образом, реплицировать вместе с геномом хозяина. Кроме того, некоторые векторы способны контролировать экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы в настоящем документе называют «рекомбинантными экспрессирующими векторами» (или просто «рекомбинантными векторами»). В общем случае экспрессирующие векторы можно применять в методиках рекомбинантных ДНК, часто в виде плазмид. В настоящем описании термины «плазида» и «вектор» могут использоваться на равных основаниях, поскольку плазида является наиболее часто используемым видом вектора.

[0084] Подразумевается, что термин «цистрон» в настоящем документе относится к генетическому элементу, в широком смысле слова эквивалентного единице трансляции в составе нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную цепь и прилегающие контрольные области. «Цистрон» может включать, например, одну или более открытые рамки считывания, область инициации трансляции (TIR, согласно определению, приведенному ниже), сигнальную последовательность и область терминации.

[0085] Термин «полицистронный» экспрессирующий вектор относится к одиночному вектору, содержащему и экспрессирующему несколько цистронов под контролем одного промотора. Распространенным примером полицистронного вектора является «дицистронный» вектор, содержащий и экспрессирующий два различных полипептида

под контролем одного промотора. При экспрессии дицистронного или полицистронного вектора несколько генов вначале транскрибируются в виде одиночной единицы транскрипции, а затем транслируются по отдельности.

[0086] «Единица транскрипции» относится к полинуклеотиду, транскрибируемому в виде одиночного РНК-транскрипта. «Единица трансляции» относится к сегменту полинуклеотида, кодирующему и при трансляции продуцирующему полипептид. Как описано выше, полицистронный полинуклеотид может содержать одну единицу транскрипции с несколькими единицами трансляции.

[0087] Вектор, экспрессирующий «отдельный цистрон» согласно настоящему изобретению, относится к одиночному вектору, содержащему по меньшей мере две отдельных пары промотор-цистрон, причем каждый цистрон находится под контролем своего собственного промотора. При экспрессии вектора, экспрессирующего отдельный цистрон, процессы транскрипции и трансляции различных генов являются отдельными и независимыми.

[0088] Термин «шаперонный белок» в настоящем документе относится к любому белку, способствующему фолдингу или сборке других макромолекул, включая, без ограничения, двуцепочечные белки. Как правило, шаперонные белки могут использоваться в различных механизмах, способствующих фолдингу или сборке белка. Например, шаперонные белки могут способствовать фолдингу и/или сборке белка, катализировать образование внутрицепочечных дисульфидных связей, способствовать денатурации и/или разборке белка (например, агрегированных или подвергшихся неправильному фолдингу белков или полипротеиновых комплексов), предотвращать агрегацию, способствовать разложению белка и т.д.

[0089] «Область инициации трансляции» или TIR или последовательность инициации трансляции в настоящем документе относится к области нуклеиновой кислоты, обеспечивающей эффективность инициации трансляции исследуемого гена. В общем случае TIR в рамках конкретного цистрона охватывает сайт связывания рибосом (RBS) и последовательности, прилегающие к RBS с 5'-конца и с 3'-конца. Согласно определению, RBS содержит как минимум область Шайна-Дальгарно и стартовый кодон (AUG). Соответственно, TIR также содержит по меньшей мере часть транслируемой нуклеотидной последовательности. Предпочтительно, TIR согласно настоящему изобретению содержит сигнальную последовательность секреции, кодирующую сигнальный пептид, которая предшествует последовательности, кодирующей легкую или тяжелую цепь в пределах цистрона. Вариант TIR содержит варианты последовательности (в частности, замены) в пределах области TIR, меняющие свойство TIR, например, эффективность трансляции, согласно определению, приведенному ниже в настоящем документе. Предпочтительно, вариант TIR согласно настоящему изобретению содержит замены в первых 2-14, предпочтительно около в 4-12, более предпочтительно около в 6 кодонах сигнальной последовательности секреции, предшествующей кодирующей последовательности легкой или тяжелой цепи в пределах цистрона.

[0090] Термин «эффективность трансляции» в настоящем документе относится к измерению секретируемого полипептида в контрольной системе, где один или несколько вариантов TIR используют для контроля секреции полипептида, и результаты сравнивают с TIR дикого типа или некоторыми другими контролями при аналогичных условиях культивирования и анализа. Безотносительно к теоретическим представлениям, «эффективность трансляции» в настоящем документе может включать, например, без ограничения, меру стабильности мРНК, эффективности связывания рибосом с сайтом

связывания рибосом и т.д.

[0091] «Сигнальная последовательность секреции» или «сигнальная последовательность» относится к нуклеотидной последовательности, кодирующей короткий сигнальный пептид, который можно использовать для направления вновь синтезированного исследуемого белка через клеточную мембрану, обычно внутреннюю мембрану или внутреннюю и наружную мембраны прокариот. В силу этого, исследуемый белок, например, полипептид легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина, секретируется в периплазму прокариотической клетки-хозяина или в культуральную среду. Сигнальный пептид, кодируемый сигнальной последовательностью секреции, может быть эндогенным по отношению к клеткам-хозяевам или экзогенным, включая сигнальные пептиды, нативные для экспрессируемого полипептида. Сигнальные последовательности секреции обычно присутствуют на N-конце экспрессируемого полипептида и обычно удаляются с помощью фермента между биосинтезом и секрецией полипептида из цитоплазмы. Таким образом, сигнальный пептид обычно не присутствует в зрелом белковом продукте.

[0092] Термин «функционально связанный» относится к сопоставлению двух или более компонентов, где компоненты, описанные таким образом, взаимодействуют, что позволяет им функционировать надлежащим для них образом. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если он действует в цис-положении, контролируя или модулируя транскрипцию связанной последовательности. Как правило, но необязательно, «функционально связанные» последовательности ДНК прилегают друг к другу и, при необходимости объединения двух областей, кодирующих белки, или в случае секреторного лидера, прилегают друг к другу и находятся в одной рамке считывания. Вместе с тем, хотя функционально связанный промотор обычно находится выше кодирующей последовательности, он не обязательно прилегает к ней. Функционально связанные энхансеры могут располагаться выше, в пределах или ниже кодирующей последовательности и на значительном расстоянии от промотора. Связывание осуществляют рекомбинантными способами, известными в данной области техники, например, с использованием методологии ПЦР, отжига или лигирования по стандартным сайтам рестрикции. Если стандартные сайты рестрикции отсутствуют, в соответствии с обычной практикой используют синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры.

[0093] Термин «регуляторные элементы» в настоящем документе относится к нуклеотидным последовательностям, расположенным в цис-положении, что необходимо для транскрипции и трансляции полинуклеотида, кодирующего гетерологичный полипептид, в полипептиды. Транскрипционные регуляторные элементы обычно содержат промотор в 5'-положении по отношению к последовательности экспрессируемого гена, сайты инициации и терминации транскрипции и сигнальную последовательность полиаденилирования. Термин «сайт инициации транскрипции» относится к нуклеиновой кислоте в составе конструктора, соответствующего первой нуклеиновой кислоте, входящей в первичный транскрипт, т.е. предшественник мРНК; сайт инициации транскрипции может перекрываться с последовательностями промотора.

[0094] Термин «промотор» относится к полинуклеотидной последовательности, контролирующей транскрипцию гена или последовательности, с которой он функционально связан. Промотор включает сигналы для связывания РНК-полимеразы и инициации транскрипции. Используемые промоторы должны работать в клетке-хозяине, в которой предполагается экспрессия выбранной последовательности. Большое количество промоторов, включая конститутивные, индуцибельные и репрессируемые

промоторы из ряда различных источников, известно в данной области техники (и представлено в таких базах данных, как GenBank) и доступно в виде или в составе клонированных полинуклеотидов (например, из таких депозитариев, как АТСС, а также других коммерческих или отдельных источников). Активность индуцибельных промоторов увеличивается или уменьшается в ответ на сигнал, например, присутствие IPTG или исчерпание фосфата.

[0095] Подразумевается, что термин «клетка-хозяин» (или «рекомбинантная клетка-хозяин») в настоящем документе относится к клетке, подвергшейся генетической модификации, или пригодной для генетической модификации путем введения экзогенного полинуклеотида, например, рекомбинантной плазмиды или вектора. Следует понимать, что такие термины предназначены для обозначения не только конкретной клетки, но и потомства такой клетки. Поскольку в последующих поколениях возможны некоторые модификации из-за мутаций или воздействия окружающей среды, такое потомство может быть фактически не идентично исходной клетке, но по-прежнему должно входить в рамки термина «клетка-хозяин», используемого в настоящем документе.

[0096] Термин "фармацевтический состав" относится к препарату, который находится в такой форме, чтобы обеспечить эффективную биологическую активность активного ингредиента, и не содержит дополнительных компонентов, являющихся неприемлемо токсичными для субъекта, которому должна быть введена композиция. Такие составы являются стерильными. «Фармацевтически приемлемые» вспомогательные вещества (носители, добавки) представляют собой вещества, которые целесообразно вводить субъекту-млекопитающему для обеспечения эффективной дозы применяемого активного ингредиента.

[0097] «Субъект» или «индивид» для целей лечения относится к любому животному, относящемуся к млекопитающим, включая людей, домашних и сельскохозяйственных животных и животных, содержащихся в зоопарках, использующихся при занятиях спортом, или комнатных животных, например, собак, лошадей, кошек, коров и т.д. Предпочтительно млекопитающее представляет собой человека.

[0098] Термин «антитело» в настоящем документе используется в самом широком смысле и, конкретно, включает моноклональные антитела (в том числе полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они проявляют желательную биологическую активность.

[0099] «Выделенное» антитело представляет собой антитело, идентифицированное и отделенное и/или извлеченное из компонентов его природного окружения.

Загрязняющие компоненты окружающей природной среды представляют собой материалы, которые могут мешать исследовательскому, диагностическому или терапевтическому применению антитела, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В некоторых вариантах реализации антитело является очищенным (1) более чем на 95% по массе антитела, согласно, например, методике Лоури, а в некоторых вариантах реализации - более чем на 99% по массе; (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности путем использования, например, секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до однородности согласно электрофорезу в ДСН-ПААГ в восстановительных или невосстановительных условиях с использованием, например, красителя Кумасси синего или серебряного. Выделенное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один из компонентов природной среды антитела отсутствует. При этом, как

правило, выделенное антитело получают с использованием по меньшей мере одного этапа очистки.

[0100] «Природные антитела» обычно представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины с молекулярной массой около 150000 дальтон, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, хотя количество дисульфидных связей варьирует среди тяжелых цепей различных изотипов иммуноглобулинов. Каждая тяжелая и легкая цепи также имеет расположенные с равными интервалами внутрицепочечные дисульфидные мостики. На одном конце каждой тяжелой цепи находится переменный домен (V_H), а затем - ряд константных доменов. На одном конце каждой легкой цепи находится переменный домен (V_L), а на другом конце - константный домен; константный домен легкой цепи выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи, а переменный домен легкой цепи выровнен с переменным доменом тяжелой цепи. Предполагается, что конкретные аминокислотные остатки должны образовывать область разделения между переменными доменами легкой цепи и тяжелой цепи.

[0101] Термин «константный домен» относится к части молекулы иммуноглобулина, содержащей более консервативную аминокислотную последовательность по сравнению с другой частью иммуноглобулина, переменным доменом, который содержит сайт связывания антигена. Константный домен содержит C_H1 , C_H2 и C_H3 -домены (совместно называемые CH-доменами) тяжелой цепи и C_HL - (или CL -) домен легкой цепи.

[0102] «Переменная область» или «переменный домен» антитела относится к N-концевым доменам тяжелой или легкой цепи антитела. Переменный домен тяжелой цепи можно называть " V_H " Переменный домен легкой цепи можно называть " V_L ". Эти домены обычно являются наиболее изменчивыми частями антитела и содержат сайты связывания антигенов.

[0103] Термин «переменный» относится к тому факту, что последовательности некоторых частей переменных доменов сильно различаются у разных антител и вносят вклад в связывание и специфичность каждого конкретного антитела по отношению к его конкретному антигену. В то же время изменчивость не является равномерно распределенной по переменным доменам антител. Она сосредоточена в трех сегментах переменных доменов как легкой, так и тяжелой цепи, называемых гиперпеременными областями (HVR). Более консервативные фрагменты переменных доменов называются каркасными областями (FR). Каждый переменный домен природных легких и тяжелых цепей содержит четыре FR-области, преимущественно принимающих конфигурацию бета-листа и соединенных тремя HVR, образующими петли, соединяющие структуры бета-типа, а в некоторых случаях - являющиеся их частью. HVR каждой цепи объединены друг с другом в непосредственной близости от FR-областей и, вместе с HVR другой цепи, участвуют в образовании антигенсвязывающего сайта антитела (см., Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)). Константные домены не принимают непосредственного участия в связывании антитела с антигеном, однако проявляют различные эффекторные функции, например, участие антитела в антитело-зависимой клеточной токсичности.

[0104] «Легкие цепи» антител (иммуноглобулинов) любого вида млекопитающих можно отнести к одному из двух четко различных типов, называемых каппа (κ) и лямбда (λ), на основе аминокислотных последовательностей их константных доменов.

[0105] Под термином «изотип» или «подкласс» IgG в настоящем документе подразумевается любой подкласс иммуноглобулинов, заданный химическими и антигенными характеристиками их константных областей.

[0106] В зависимости от аминокислотных последовательностей константных доменов тяжелых цепей, антитела (иммуноглобулины) можно отнести к различным классам. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG, и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Константные домены тяжелой цепи, соответствующие различным классам иммуноглобулинов, называются α , γ , ϵ , μ и δ , соответственно. Хорошо известны субъединичная структура и трехмерная конфигурация различных классов иммуноглобулинов, которые в общем случае описаны, например, в публикации Abbas et al. *Cellular and Mol. Immunology*, 4th ed. (W.B. Saunders, Co., 2000). Антитело может являться частью более крупной гибридной молекулы, образованной путем ковалентного или нековалентного связывания антитела с одним или несколькими другими белками или пептидами.

[0107] Термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» и «целое антитело» в настоящем документе являются взаимозаменяемыми и относятся к антителу в практически интактной форме, а не фрагментам антител, определение которых приведено ниже. Эти термины в особенности относятся к антителу с тяжелыми цепями, содержащими Fc-область.

[0108] Термин «свободное антитело» относится к антителу, не конъюгированному с цитотоксической группой или радиоактивной меткой.

[0109] «Фрагменты антитела» содержат часть интактного антитела, предпочтительно содержащую его антигенсвязывающую область. В некоторых вариантах реализации фрагмент антитела, описанный в настоящем документе, является антигенсвязывающим фрагментом. Примеры фрагментов антител включают Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv-фрагменты; диантитела; линейные антитела; одноцепочечные антитела; и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

[0110] При папаиновом гидролизе антител образуются два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых «Fab»-фрагментами, каждый из которых содержит одиночный антигенсвязывающий сайт, и остаточный «Fc»-фрагмент, название которого отражает его способность к кристаллизации. Обработка пепсином позволяет получить F(ab')₂-фрагмент, содержащий два антигенсвязывающих сайта и по-прежнему способный к перекрестному связыванию антигена.

[0111] «Fv» представляет собой минимальный фрагмент антитела, содержащий полный антигенсвязывающий сайт. В одном варианте реализации двуцепочечная разновидность Fv состоит из димера одного вариабельного домена тяжелой цепи и одного вариабельного домена легкой цепи, соединенных жесткой нековалентной связью. В однойцепочечных разновидностях Fv (scFv) один вариабельный домен тяжелой цепи и один вариабельный домен легкой цепи могут быть ковалентно связаны гибким пептидным линкером таким образом, что легкая и тяжелая цепи могут образовывать «димерную» структуру, аналогичную структуре двуцепочечных разновидностей Fv. Именно в этой конфигурации три HVR каждого вариабельного домена взаимодействуют с образованием антигенсвязывающего домена на поверхности димера VH-VL. Совместно шесть HVR придают антителу специфичность связывания с антигеном. В то же время даже один вариабельный домен (или половина Fv, содержащая только три HVR, специфичных по отношению к антигену) обладает способностью распознавать и

связывать антиген, хотя и с более низким сродством, чем полный сайт связывания.

[0112] Fab-фрагмент содержит переменные домены тяжелой и легкой цепи, а также константный домен легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи.

Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов добавлением нескольких остатков на С-конце CH1-домена тяжелой цепи, содержащие один или более остатков цистеина из шарнирной области антитела. Fab'-SH в данном документе представляет собой обозначение Fab', в котором остаток(ки) цистеина в константных доменах несет(ут) свободную тиоловую группу. Фрагменты антител F(ab')₂ первоначально получали в виде пар фрагментов Fab', между которыми расположены шарнирные остатки цистеина. Кроме того, известны другие варианты химического соединения фрагментов антител.

[0113] «Одноцепочечные Fv-фрагменты» или «scFv»-фрагменты антитела содержат VH- и VL-домены антитела, причем эти домены находятся в одной полипептидной цепи. Как правило, полипептид scFv дополнительно содержит полипептидный линкер между VH- и VL-доменами, позволяющий scFv образовывать желательную структуру для связывания антигена. Обзор фрагментов scFv приведен, например, Pluckthün, в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315.

[0114] Термин «диатела» относится к фрагментам антител, содержащим два антигенсвязывающих сайта, причем указанные фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи (VH), связанный с переменным доменом легкой цепи (VL) той же полипептидной цепи (VH-VL). За счет линкера, который является слишком коротким, чтобы обеспечить сопряжение между двумя доменами на одной той же цепи, домены вынуждены соединяться с комплементарными доменами другой цепи и образовывать два антигенсвязывающих сайта. Диатела могут быть двухвалентными или биспецифическими. Диатела подробнее описаны в, например, EP 404.097; WO 1993/01161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); and Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). Триатела и тетратела также описаны в публикации Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

[0115] Термин «моноклональное антитело» в настоящем документе относится к антителу, полученному из популяции практически однородных антител, например, отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных мутаций, например, естественных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Таким образом, определение «моноклональное» указывает на то, что антитело не является смесью отдельных антител. В некоторых вариантах реализации такое моноклональное антитело обычно содержит антитело, содержащее полипептидную последовательность, связывающую мишень, причем указанную полипептидную последовательность, связывающую мишень, получают за счет способа, включающего выбор одной полипептидной последовательности, связывающей мишень, из множества полипептидных последовательностей. Например, процесс выбора может представлять собой выбор уникального клона из множества клонов, например, пула гибридных клонов, фаговых клонов или клонов рекомбинантных ДНК. Следует понимать, что выбранную последовательность, связывающую мишень, можно дополнительно модифицировать, например, с целью улучшения сродства по отношению к мишени, гуманизации последовательности, связывающей мишень, улучшения ее продукции в культуре клеток, снижения ее иммуногенности *in vivo*, создания полиспецифического антитела и т.д., и что антитело, содержащее модифицированную последовательность, связывающую мишень, также является моноклональным антителом согласно настоящему изобретению. В отличие

от препаратов поликлональных антител, которые как правило содержат различные антитела против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело из препарата моноклонального антитела направлено против одной детерминанты антигена. Кроме специфичности, преимуществом препаратов моноклональных антител

обычно является отсутствие загрязнения другими иммуноглобулинами.

[0116] Определение "моноклональное" указывает на свойство антитела, как на полученное из практически гомогенной популяции антител, и его не следует интерпретировать как требование относительно продуцирования антитела посредством какого-либо конкретного способа. Например, моноклональные антитела, которые предполагается применять в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены различными способами, включая, например, метод гибридом (например, Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo et al., *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), рекомбинантные ДНК-методы (см., например, патент США № 4816567), технологии фаговых дисплеев (см., например, Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); и Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004), и технологии

продукции антител человека или аналогов антител человека в организмах животных, частично или полностью содержащих локусы или гены иммуноглобулинов человека, кодирующие последовательности иммуноглобулинов человека (см., например, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7:33 (1993); патенты США № 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; и 5661016; Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); и Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

[0117] Моноклональные антитела в настоящем документе включают «химерные» антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям антител конкретного вида животных или антител, принадлежащих к конкретному классу или подклассу, в то время как остальная часть цепи(ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям антител другого вида животных или антител, принадлежащих к другому классу или подклассу, а также фрагменты таких антител, при условии, что они демонстрируют желательную биологическую активность (см., например, патент США № 4816567; и Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Химерные антитела включают PRIMATIZED[®] антитела, в которых антигенсвязывающая область антитела происходит от антител, полученных, например, путем иммунизации макаков исследуемым антигеном.

[0118] «Гуманизированные» формы антител нечеловеческого происхождения (например, мыши) представляют собой химерные антитела, содержащие минимальные последовательности, происходящие от иммуноглобулина нечеловеческого происхождения. В одном варианте реализации гуманизированное антитело представляет собой иммуноглобулин человека (реципиентное антитело), в котором остатки из HVR реципиента заменяют остатками из HVR вида, не являющегося человеком (донорного антитела), например, мыши, крысы, кролика или примата, не являющегося человеком,

обладающий желательной специфичностью, сродством и/или активностью. В некоторых случаях FR-остатки иммуноглобулина человека заменяют соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Кроме того, гуманизированные антитела могут

содержать остатки, не встречающиеся в реципиентном антителе или донорском антителе. Эти модификации можно внести для дальнейшего улучшения характеристик антитела. В общем случае, гуманизированное антитело содержит практически все из по меньшей мере одного, а обычно - двух переменных доменов, в которых все или практически все гиперпеременные петли соответствуют аналогичным участкам из иммуноглобулина нечеловеческого происхождения, и все или практически все FR-

области соответствуют последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело также необязательно содержит по меньшей мере фрагмент константного участка иммуноглобулина (Fc), обычно происходящий из иммуноглобулина человека. Дополнительную информацию см., например, в публикациях Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). См., также, например, Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurler and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); и патенты США № 6982321 и 7087409.

[0119] «Антитело человека» представляет собой антитело, обладающее аминокислотной последовательностью, соответствующей последовательности антитела, продуцированного в организме человека и/или полученной с использованием любой методики получения антител человека, описанных в настоящем документе. Из этого определения антитела человека, в частности, исключено гуманизированное антитело, содержащее антигенсвязывающие остатки нечеловеческого происхождения. Антитела человека можно получить, используя различные методики, известные в данной области техники, в том числе библиотеки фагового дисплея. Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). Кроме того, моноклональные антитела человека можно получить с помощью способов, описанных в публикациях Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). См. также van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Антитела человека можно получить путем введения антигена в организм трансгенного животного, модифицированного с целью продукции таких антител в ответ на антигенную стимуляцию, причем эндогенные локусы указанного животного отключены, например, иммунизированных ксеномышей (см., например, патенты США № 6075181 и 6150584, рассматривающие технологию XENOMOUSETM). Кроме того, информацию об антителах человека, полученных посредством технологии В-клеточных гибридом человека, см., например, Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 3557-3562 (2006).

[0120] «Видоспецифичное антитело» представляет собой антитело, обладающее более сильным сродством к антигену у первого вида млекопитающих, чем к гомологу этого антигена у второго вида млекопитающих. Как правило, видоспецифичное антитело «специфически связывается» с антигеном человека (например, обладает значением сродства связывания (Kd) не более 1×10^{-7} М, предпочтительно не более 1×10^{-8} М и предпочтительно не более 1×10^{-9} М), однако обладает сродством к гомологу антигена у второго вида млекопитающих, не являющегося человеком, по меньшей мере около 50-кратно, или по меньшей мере около 500-кратно, или по меньшей мере около 1000-кратно более слабым, чем его сродство к антигену человека. Видоспецифичное антитело

может относиться к любому из различных типов антител, как определено выше, однако предпочтительно является гуманизированным антителом или антителом человека.

[0121] Термин «гипервариабельная область», «HVR» или «HV» в настоящем документе относится к областям вариабельного домена антитела, обладающим

гипервариабельными последовательностями и/или образующим структурно определенные петли. Как правило, антитела содержат шесть HVR: три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). В нативных антителах H3 и L3 проявляют наибольшее многообразие из шести HVR, и, в частности, полагают, что H3 играет уникальную роль в обеспечении высокой специфичности антител. См., например, Xu et al., *Immunity* 13: 37-45 (2000); Johnson and Wu, in *Methods in Molecular Biology* 248: 1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, N. J., 2003). Фактически, природные антитела верблюдовых, состоящие только из тяжелой цепи, являются функциональными и стабильными в отсутствие легкой цепи. См., например, Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff et al., *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

[0122] Существует ряд определений HVR, охватываемых настоящей заявкой. Определение согласно Кабату областей, определяющих комплементарность (CDR), основано на изменчивости последовательности и используется наиболее часто (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Chothia вместо этого указывает на расположение структурных петель (Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). AbM HVR представляют собой компромисс между HVR по Кабату и структурными петлями по Chothia, и используются программным обеспечением для моделирования антител AbM от Oxford Molecular. «Контактные» HVR основаны на анализе доступных сложных кристаллических структур. Остатки из каждого из этих HVR указаны ниже.

Таблица 1а. Гипервариабельные области антитела

Петля	Kabat	AbM	Chothia	Контакт
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B Нумерация по Кабату
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Нумерация по Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0123] HVR могут содержать "расширенные HVR": 24-36 или 24-34 (L1), 46-56 или 50-56 (L2) и 89-97 или 89-96 (L3) в VL, и 26-35 (H1), 50-65 или 49-65 (H2), и 93-102, 94-102 или 95-102 (H3) в VH. Для каждого из этих определений остатки вариабельного домена пронумерованы согласно Kabat et al., *supra*.

[0124] «Каркасные» или «FR»-остатки представляют собой остатки вариабельного домена, не являющиеся остатками HVR, согласно определению в настоящем документе.

[0125] Термины «нумерация остатков вариабельного домена по Кабату» или «нумерация положений аминокислот по Кабату» и их варианты относятся к системе нумерации, используемой для вариабельных доменов тяжелой или легкой цепи согласно представлению об антителах в публикации Kabat et al., *supra*. При использовании этой системы нумерации фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество аминокислот или дополнительные аминокислоты, соответствующие укорачиванию или инсерции в FR или HVR вариабельного домена. Например, вариабельный домен тяжелой цепи может содержать себя инсерцию одной

аминокислоты (остаток 52А по Кабату) после 52 остатка в H2 и вставленные остатки (например, остатки 82А, 82b и 82с и т.д. по Кабату) после 82 остатка FR тяжелой цепи. Нумерацию остатков по Кабату можно определить для данного антитела путем выравнивания областей гомологии последовательности антитела со «стандартной» пронумерованной по Кабату последовательностью.

[0126] Систему нумерации Кабата обычно используют при упоминании остатка переменного домена (приблизительно остатки 1-107 легкой цепи и остатки 1-113 тяжелой цепи) (например, Kabat *et al.*, *Sequences of Immunological Interest*. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Как правило, "система нумерации ЕС" или "индекс ЕС" используется, когда речь идет об остатке в константной области тяжелой цепи иммуноглобулина (например, индекс ЕС, описанный в Kabat *et al.*, *supra*). «Индекс ЕС по Кабату» относится к нумерации остатков ЕС IgG1-антитела человека.

[0127] Выражение «линейные антитела» относится к антителам, описанным в статье Zapata *et al.* (1995 *Protein Eng*, 8(10):1057-1062). Вкратце, эти антитела содержат пару tandemных Fd-сегментов (VH-CH1-VH-CH1), которые вместе с комплементарными полипептидами легкой цепи образуют пару антигенсвязывающих областей. Линейные антитела могут быть биспецифическими или моноспецифическими.

II. Молекулярная оптимизация

[0128] В настоящем документе предложены способы получения полипептида, содержащего две цепи, в прокариотической клетке-хозяине, посредством культивирования клетки-хозяина с целью экспрессии двух цепей полипептида, при котором после экспрессии происходит фолдинг и сборка двух цепей с образованием биологически активного полипептида в клетке-хозяине; причем клетка-хозяин содержит полинуклеотид, содержащий (1) первую единицу трансляции, кодирующую первую цепь полипептида; (2) вторую единицу трансляции, кодирующую вторую цепь полипептида; и (3) третью единицу трансляции, кодирующую по меньшей мере один белок-шаперон, выбранный из пептидил-пролил-изомераз, протеин-дисульфид-оксидоредуктаз и их комбинаций. Кроме того, в настоящем документе предложены способы получения полипептида, содержащего две цепи, в прокариотической клетке-хозяине, посредством культивирования клетки-хозяина с целью экспрессии двух цепей полипептида, при котором после экспрессии происходит фолдинг и сборка двух цепей с образованием биологически активного полипептида в клетке-хозяине; причем клетка-хозяин содержит полинуклеотид, содержащий (1) первую единицу трансляции, кодирующую первую цепь полипептида; (2) вторую единицу трансляции, кодирующую вторую цепь полипептида; (3) третью единицу трансляции, кодирующую первый белок-шаперон; (4) четвертую единицу трансляции, кодирующую второй белок-шаперон; и (5) пятую единицу трансляции, кодирующую третий белок-шаперон, причем первый, второй и третий белки-шапероны выбраны из пептидил-пролил-изомераз, протеин-дисульфид-оксидоредуктаз и их комбинаций.

[0129] В некоторых вариантах реализации клетку-хозяина культивируют с целью экспрессии двух цепей полипептида, при котором после экспрессии происходит фолдинг и сборка двух цепей с образованием биологически активного полипептида в клетке-хозяине. В настоящем документе фолдинг и сборка двух цепей могут относиться к любому или всем этапам, способствующим окончательному принятию двуцепочечным белком надлежащей трехмерной конформации белка, сборке двуцепочечного белка или обоим этим процессам. Фолдинг и сборка могут относиться к фолдингу и сборке каждой цепи с формированием ее надлежащей конформации, или к фолдингу и сборке

комплекса, образованного межмолекулярными связями двух белковых цепей. Аналогично, каждая цепь может подвергаться фолдингу и сборке с образованием биологически активного полипептида, или комплекс, образованный межмолекулярными связями двух белковых цепей, может подвергаться фолдингу и сборке с образованием биологически активного полипептида как целого.

[0130] Биологически активный полипептид может относиться к любому полипептиду, способному выполнять функцию, приписываемую указанному полипептиду. Функции биологически активных полипептидов могут включать, без ограничений, надлежащий фолдинг или сборку, связывание или другое взаимодействие с другой макромолекулой, и ферментативную активность. В качестве иллюстрации, биологически активное антитело может относиться к антителу, способному выполнять по меньшей мере одну функцию, приписываемую антителам, включая, без ограничения, связывание с эпитопом или свойства Fc-области антитела, как подробнее описано ниже.

Белки-шапероны

[0131] В некоторых вариантах реализации полинуклеотид согласно настоящему изобретению содержит единицу трансляции, кодирующую по меньшей мере один белок-шаперон. Как описано выше, термин «белок-шаперон» может относиться к любому белку, способствующему фолдингу или сборке других макромолекул, включая, без ограничения, двцепочечные белки. Примеры белков-шаперонов могут включать, без ограничений, пептидил-пролил-изомеразы, протеин-дисульфид-оксидоредуктазы и белки теплового шока (например, белки Hsp60, Hsp70, Hsp90 и Hsp100). Белки-шапероны могут также способствовать транспортировке белков через мембраны, например, транслокации полипептидных цепей через плазматическую мембрану или мембрану эндоплазматического ретикула.

[0132] В некоторых вариантах реализации белок-шаперон может представлять собой пептидил-пролил-изомеразу. Пептидил-пролил-изомераза (термины «пролилизомераза», «ротамаза» и «PPIаза» могут использоваться в настоящем документе на равных основаниях) может относиться к любому ферменту, катализирующему взаимное преобразование цис- и транс-изомеров пролина или пролилиминопептидных связей ЕС-номер этой реакции - ЕС 5.2.1.8. Любой белок с известной или прогнозируемой способностью катализировать реакцию, описанную в ЕС под этим номером, может являться пептидил-пролил-изомеразой согласно настоящему изобретению. Пептидил-пролил-изомеразную активность также можно описать GO-термином ID GO:0003755. Любой белок с известной или прогнозируемой молекулярной функцией, описанной этим термином в GO, может являться пептидил-пролил-изомеразой согласно настоящему изобретению.

[0133] В данной области техники известно, что пептидил-пролил-изомеразная активность стимулирует фолдинг и сборку белка. В некоторых вариантах реализации пептидил-пролил-изомеразы могут способствовать фолдингу и сборке белков путем преобразования транс-пролильных связей в цис-пролильные связи в белках, правильно уложенная структура которых включает цис-пролильную связь. Кроме того, известно, что некоторые пептидил-пролил-изомеразы усиливают фолдинг и сборку белков, не содержащих цис-пролильных связей (Bothmann H and Pluckthun A 2000 J. Biol. Chem. 275: 17100). В некоторых вариантах реализации пептидил-пролил-изомеразы могут способствовать фолдингу и сборке белков, не содержащих цис-пролильных связей. Таким образом, хотя пептидил-пролил-изомеразная активность может служить функциональной характеристикой для идентификации шаперонного белка, который можно использовать в способах, описанных в настоящем документе, возможности

пептидил-пролил-изомеразы не обязательно ограничивается ее каталитической активностью самой по себе.

[0134] В некоторых вариантах реализации пептидил-пролил-изомеразы представляет собой белок FkpA. В некоторых вариантах реализации белок FkpA представляет собой FkpA *E. coli*. FkpA *E. coli* может относиться к любому полипептиду, кодируемому геном fkpA любого штамма или изолята бактерии, принадлежащей к виду *E. coli*. В некоторых вариантах реализации FkpA *E. coli* относится к белку, кодируемому геном fkpA, описанным в EcoGene под номером доступа EG12900. В некоторых вариантах реализации FkpA *E. coli* относится к белку, обладающему последовательностью, описанной в NCBI RefSeq под номером доступа NP_417806.

[0135] В данной области техники известны другие белки FkpA. Примеры белков FkpA могут включать, без ограничения, пептидил-пролил-изомеразу *S. boydii* (NCBI RefSeq №. WP_000838252), пептидил-пролил-изомеразу *C. youngae* (NCBI RefSeq №. WP_006687366), пептидил-пролил-изомеразу *K. oxytoca* (NCBI RefSeq №. WP_004125943), пептидил-пролил-изомеразу *S. enterica* (NCBI RefSeq №. WP_000838233), пептидил-пролил-изомеразу *K. pneumoniae* (NCBI RefSeq №. WP_019704642), FPR3p *S. cerevisiae* (NCBI RefSeq №. NP_013637), Fkpb1a *M. musculus* (NCBI RefSeq №. NP_032045), Fkpb2 *M. musculus* (NCBI RefSeq №. NP_032046), FKBP2 *H. sapiens* (NCBI RefSeq №. NP_001128680) и CG14715 *D. melanogaster* (NCBI RefSeq №. NP_650101). В некоторых вариантах реализации белок FkpA согласно настоящему изобретению обладает по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 81%, по меньшей мере около 82%, по меньшей мере около 83%, по меньшей мере около 84%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 86%, по меньшей мере около 87%, по меньшей мере около 88%, по меньшей мере около 89%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичностью FkpA *E. coli*.

[0136] В некоторых вариантах реализации шаперонный белок может представлять собой протеиндисульфидоксидоредуктазу. Протеиндисульфидоксидоредуктаза (термины "протеиндисульфидизомераза" и "тиолдисульфидизомераза" можно использовать в настоящем документе на равных основаниях) может относиться к любому ферменту, катализирующему реаранжировку дисульфидных связей в белках. Например, протеиндисульфидоксидоредуктаза может катализировать окисление остатков цистеина с образованием дисульфидных связей в белках. Протеиндисульфидоксидоредуктаза может также катализировать изомеризацию неправильно образованных дисульфидных связей в белках. ЕС-номер этой реакции - ЕС 5.3.4.1. Любой белок с известной или прогнозируемой способностью катализировать реакцию, описанную в ЕС под этим номером, может являться протеиндисульфидоксидоредуктазой согласно настоящему изобретению. Протеиндисульфидоксидоредуктазную активность также можно описать ГО-термином ID GO:0015035. Любой белок с известной или прогнозируемой молекулярной функцией, описанной этим термином в ГО, может являться протеиндисульфидоксидоредуктазой согласно настоящему изобретению.

[0137] В данной области техники известно, что пептидил-пролил-изомеразная активность стимулирует фолдинг и сборку белка. Например, протеиндисульфидоксидоредуктазная активность способствует образованию надлежащих внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей в процессе фолдинга и сборки белка. В частности, протеиндисульфидоксидоредуктазная активность важна

для белков с дисульфидными связями, экспрессируемых в периплазме прокариотических клеток.

[0138] В некоторых вариантах реализации протеиндисульфидоксидоредуктаза является белком DsbA. В некоторых вариантах реализации белок DsbA представляет собой DsbA *E. coli*. DsbA *E. coli* может относиться к любому полипептиду, кодируемому геном *dsbA* любого штамма или изолята бактерии, принадлежащей к виду *E. coli*. В некоторых вариантах реализации DsbA *E. coli* относится к белку, кодируемому геном *dsbA*, описанным в EcoGene под номером доступа EG11297. В некоторых вариантах реализации DsbA *E. coli* относится к белку, обладающему последовательностью, описанной в NCBI RefSeq под номером доступа NP_418297.

[0139] В данной области техники известны другие белки DsbA. Примеры белков DsbA могут включать, без ограничения, тиолдисульфидизомеразу *S. flexneri* (NCBI RefSeq №. WP_000725335), тиолдисульфидизомеразу *S. dysenteriae* (NCBI RefSeq №. WP_000725348), тиолдисульфидизомеразу *C. youngae* (NCBI RefSeq №. WP_006686108) и тиолдисульфидизомеразу *S. enterica* (NCBI RefSeq №. WP_023240584). В некоторых вариантах реализации белок DsbA согласно настоящему изобретению обладает по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 81%, по меньшей мере около 82%, по меньшей мере около 83%, по меньшей мере около 84%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 86%, по меньшей мере около 87%, по меньшей мере около 88%, по меньшей мере около 89%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичностью DsbA *E. coli*.

[0140] В некоторых вариантах реализации протеиндисульфидоксидоредуктаза является белком DsbC. В некоторых вариантах реализации белок DsbC представляет собой DsbC *E. coli*. DsbC *E. coli* может относиться к любому полипептиду, кодируемому геном *dsbC* любого штамма или изолята бактерии, принадлежащей к виду *E. coli*. В некоторых вариантах реализации DsbC *E. coli* относится к белку, кодируемому геном *dsbC*, описанным в EcoGene под номером доступа EG11070. В некоторых вариантах реализации DsbC *E. coli* относится к белку, обладающему последовательностью, описанной в NCBI RefSeq под номером доступа NP_417369.

[0141] В данной области техники известны другие белки DsbC. Примеры белков DsbC могут включать, без ограничения, протеиндисульфидизомеразу *S. sonnei* (NCBI RefSeq №. WP_000715206), протеиндисульфидизомеразу *S. dysenteriae* (NCBI RefSeq №. WP_000715209), протеиндисульфидизомеразу *E. fergusonii* (NCBI RefSeq №. WP_000715225), белок DsbC *S. bongori*, осуществляющий взаимозаммену тиоловых и дисульфидных связей (NCBI RefSeq №. и протеиндисульфидизомеразу DsbC *S. enterica* (NCBI RefSeq №. WP_023183515). В некоторых вариантах реализации белок DsbC согласно настоящему изобретению обладает по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 81%, по меньшей мере около 82%, по меньшей мере около 83%, по меньшей мере около 84%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 86%, по меньшей мере около 87%, по меньшей мере около 88%, по меньшей мере около 89%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичностью DsbC *E. coli*.

[0142] Для определения процентной идентичности двух аминокислотных

последовательностей или двух нуклеотидных последовательностей указанные последовательности выравнивают с целью оптимального сравнения (например, можно ввести пробелы в одну или обе из первой и второй аминокислотной или нуклеотидной последовательности для оптимального выравнивания и пренебречь негомологичными последовательностями для целей сравнения). В одном варианте реализации длина эталонной последовательности при выравнивании для целей сравнения составляет по меньшей мере 50%, в типичных случаях по меньшей мере 75%, и в еще более типичных случаях - по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% от длины эталонной последовательности. Затем выполняют сравнение аминокислотных остатков или нуклеотидов в соответствующих положениях. Если положение в первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы являются идентичными по этому положению (в настоящем документе «идентичность» аминокислоты или нуклеиновой кислоты эквивалентна «гомологии» аминокислоты или нуклеиновой кислоты).

[0143] Процентная идентичность между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений в обеих последовательностях, принимая во внимание количество пробелов и длину каждого пробела, который необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Для сравнения последовательностей одна последовательность обычно выступает в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей тестируемые и эталонные последовательности вводят в компьютер, при необходимости обозначают координаты подпоследовательностей, а также параметры программы алгоритма последовательности. Можно использовать параметры программы по умолчанию или указать альтернативные параметры. Затем алгоритм сравнения последовательностей рассчитывает процентную идентичность тестируемых последовательностей по отношению к эталонной последовательности на основании параметров программы. При сравнении двух последовательностей для оценки идентичности необходимость в том, чтобы эти последовательности были смежными, отсутствует, однако за пробелы накладывается штраф, что приводит к снижению общей процентной идентичности. В blastn штраф за открытие пробела по умолчанию=5, а штраф за удлинение пробела=2. В blastp штраф за открытие пробела по умолчанию=11, а штраф за удлинение пробела=1.

[0144] "Окно сравнения" в настоящем документе включает упоминание сегмента, содержащего любое количество смежных положений, выбранное из группы, состоящей из 20-600, обычно из около 50-200, в более обычном случае из около 100-150, в которых последовательность можно сравнить с эталонной последовательностью аналогичного количества смежных положений после оптимального выравнивания двух последовательностей. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно выполнить с использованием известных алгоритмов (например, с помощью алгоритма локальной гомологии Smith and Waterman, Adv Appl Math, 2:482, 1981; алгоритма гомологичного выравнивания Needleman and Wunsch, J Mol Biol, 48:443, 1970; способа поиска подобия Pearson and Lipman, Proc Natl Acad Sci USA, 85:2444, 1988, компьютеризированной реализации этих алгоритмов FASTDB (Intelligenetics), BLAST (Национальный центр по биомедицинской информации), GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, Мэдисон, штат Висконсин, США), или с помощью ручного выравнивания и

визуального осмотра.

[0145] Предпочтительным примером алгоритма, подходящего для определения процентной идентичности и сходства последовательностей, является алгоритм FASTA (Pearson and Lipman, Proc Natl Acad Sci USA, 85:2444, 1988; и Pearson, Methods Enzymol, 266:227-258, 1996). Предпочтительные параметры, используемые при FASTA-выравнивании последовательностей ДНК для вычисления процентной идентичности, являются оптимизированными: матрица BL50 15:-5, размер участка максимального совпадения=2; штраф за соединение=40, оптимизация=28; штраф за пробел - 12, штраф за удлинение пробела =-2; и ширина=16.

[0146] Еще одним предпочтительным примером алгоритмов, подходящих для определения процентной идентичности и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0 (Altschul et al., Nuc Acids Res, 25:3389-3402, 1977; и Altschul et al., J Mol Biol, 215:403-410, 1990, соответственно). Для определения процентной идентичности последовательностей нуклеиновых кислот и белков согласно настоящему изобретению используют BLAST и BLAST 2.0 с параметрами, описанными в настоящем документе. Программное обеспечение для выполнения BLAST-анализа общедоступно на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации. Этот алгоритм предусматривает вначале выявление пар сегментов с максимальным сходством (HSP) путем выявления коротких слов длины W в рассматриваемой последовательности, совпадающих или соответствующих некоторому положительному пороговому показателю T при выравнивании со словом той же длины в последовательности из базы данных. T называют пороговым показателем соседних слов. Эти совпадения начальных соседних слов выступают в качестве отправных точек для начала поиска большего количества HSP, содержащих их. Совпадения слов удлиняют в обоих направлениях вдоль каждой последовательности, пока можно увеличить совокупный показатель выравнивания. Совокупные показатели рассчитывают с использованием параметров M (показатель поощрения за пару совпадающих остатков; всегда > 0) для нуклеотидных последовательностей и N (показатель штрафа за несовпадающие остатки; всегда < 0). Для аминокислотных последовательностей при расчете совокупного показателя используют матрицу показателей. Удлинение совпадений слов в каждом направлении останавливается при следующих условиях: совокупный показатель выравнивания снижается на величину X по сравнению с максимальным достигнутым значением; совокупный показатель достигает нуля или меньшего значения за счет накопления одного или более выровненных остатков с отрицательным показателем; или при достижении конца любой из последовательностей. Параметры W, T и X алгоритма BLAST определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программа BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) использует по умолчанию длину слова (W) 11, ожидаемое значение (E) 10, M=5, N=-4 и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей программа BLASTP использует по умолчанию длину слова 3, ожидаемое значение (E) 10 и матрицу оценки BLOSUM62 (Henikoff and Henikoff, Proc Natl Acad Sci USA, 89:10915, 1989), количество выравниваний (B) 50, ожидаемое значение (E) 10, M=5, N=-4 и сравнение обеих цепей.

[0147] Алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin and Altschul, Proc Natl Acad Sci USA, 90:5873-5787, 1993). Одним из показателей сходства, получаемых алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность (P(N)), которая дает представление о вероятности случайного совпадения между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями. Например, считается, что нуклеиновая кислота сходна с

эталонной последовательностью, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении анализируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет менее около 0,2, более предпочтительно - менее около 0.01 и наиболее предпочтительно - менее около 0,001.

5 [0148] Еще одним примером применимого алгоритма является PILEUP. PILEUP выполняет множественное выравнивание последовательностей из группы родственных последовательностей с использованием прогрессивного попарного выравнивания с целью демонстрации взаимосвязи и процентной идентичности последовательностей. Он также строит дерево или дендрограмму, на которой показана кластеризация
10 взаимосвязей, используемая для выполнения выравнивания. PILEUP использует упрощенный способ прогрессивного выравнивания (Feng and Doolittle, J Mol Evol, 35: 351-360, 1987), аналогичный опубликованному способу (Higgins and Sharp, CABIOS 5: 151-153, 1989). Данная программа может выполнять выравнивание до 300 последовательностей, максимальная длина каждой из которых составляет 5000
15 нуклеотидов или аминокислот. Процедура множественного выравнивания начинается с попарного выравнивания двух наиболее сходных последовательностей с получением кластера из двух выровненных последовательностей. Затем этот кластер выравнивают со следующей наиболее родственной последовательностью или кластером выровненных последовательностей. Два кластера последовательностей выравнивают путем простого
20 удлинения попарного выравнивания двух отдельных последовательностей. Окончательное выравнивание достигается посредством серии прогрессивных попарных выравниваний. Программу запускают с указанием специфических последовательностей и координат аминокислот или нуклеотидов для областей сравнения последовательностей, а также параметров программы. С помощью PILEUP эталонную последовательность
25 сравнивают с другими анализируемыми последовательностями с целью определения процентной идентичности последовательностей, используя следующие параметры: вес пробела по умолчанию (3,00), вес длины пробела по умолчанию (0,10) и взвешенные концевые пробелы. PILEUP можно получить из программного пакета для анализа последовательностей GCG, например, версии 7.0 (Devereaux et al., Nuc Acids Res, 12:387-
30 395, 1984).

[0149] Еще одним предпочтительным примером алгоритма, подходящего для множественного выравнивания ДНК и аминокислотных последовательностей является программа CLUSTALW (Thompson et al., Nucl Acids. Res, 22:4673-4680, 1994). ClustalW выполняет множественное попарное сравнение между группами последовательностей
35 и сборку их во множественные выравнивания на основании гомологии. Штраф за открытие и удлинение пробела составлял 10 и 0,05, соответственно. Для выравнивания аминокислотных последовательностей можно применять алгоритм BLOSUM в качестве матрицы сравнения аминокислот (Henikoff and Henikoff, Proc Natl Acad Sci USA, 89:10915-10919, 1992).

40 ***Кассеты и векторы для экспрессии***

[0150] В некоторых вариантах реализации клетка-хозяин содержит полинуклеотид, содержащий (1) первую единицу трансляции, кодирующую первую цепь полипептида; (2) вторую единицу трансляции, кодирующую вторую цепь полипептида; и (3) третью
45 единицу трансляции, кодирующую по меньшей мере один белок-шаперон, выбранный из пептидил-пролил-изомераз, протеин-дисульфид-оксидоредуктаз и их комбинаций. В некоторых вариантах реализации клетка-хозяин содержит полинуклеотид, содержащий (1) первую единицу трансляции, кодирующую первую цепь полипептида; (2) вторую единицу трансляции, кодирующую вторую цепь полипептида; (3) третью единицу

трансляции, кодирующую первый белок-шаперон; (4) четвертую единицу трансляции, кодирующую второй белок-шаперон; и (5) пятую единицу трансляции, кодирующую третий белок-шаперон, причем первый, второй и третий белки-шапероны выбраны из пептидил-пролил-изомераз, протеин-дисульфид-оксидоредуктаз и их комбинаций. В ходе совершения настоящего изобретения сделано открытие, что повышенной продукции двцепочечных белков после надлежащего фолдинга и сборки можно достичь при использовании системы одной плазмиды (т.е. одного полинуклеотида, содержащего единицы трансляции, кодирующие каждую цепь двцепочечного белка, и одну или более единиц трансляции, кодирующих один или более из белков-шаперонов) или системы совместимых плазмид (т.е. первого полинуклеотида, содержащего единицы трансляции, кодирующие каждую цепь двцепочечного белка, и второго полинуклеотида, содержащего одну или более единиц трансляции, кодирующих один или более из белков-шаперонов).

[0151] В некоторых вариантах реализации полинуклеотид дополнительно содержит три копии промотора, причем первая копия функциональным образом объединена с первой единицей трансляции, вторая копия функциональным образом объединена со второй единицей трансляции, и третья копия функциональным образом объединена с третьей единицей трансляции, запуская транскрипцию первой цепи, второй цепи и белка-шаперона. В некоторых вариантах реализации две из единиц трансляции, кодирующие два из трех шаперонных белков, являются частью одиночной единицы трансляции. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид дополнительно содержит промотор, который функциональным образом объединен с каждой единицей трансляции.

[0152] В некоторых вариантах реализации промотор является индуцибельным промотором. Как описано выше, активность индуцибельного промотора может увеличиваться или уменьшаться в ответ на сигнал. Например, индуцибельный промотор может стимулировать транскрипцию в ответ на присутствие сигнала, например, IPTG. Индуцибельный промотор может стимулировать транскрипцию в ответ на отсутствие сигнала, например, фосфата. В любом из этих сценариев количественная эффективность транскрипции может быть или не быть количественно пропорциональна сигналу или его недостаточности. В данной области техники известны многочисленные примеры индуцибельных промоторов для прокариотических клеток-хозяев. Они могут включать, без ограничения, *lac*, *tac*, *trc*, *trp*, *pho*, *recA*, *tetA*, *nar*, промотор фага P_L, промоторы *cspA*, T7 и P_{BAD} (более подробную информацию см. в Terpe K. 2006 Appl. Microbiol. Biotechnol. 72:211). В некоторых вариантах реализации для скоординированного контроля экспрессии отдельных единиц трансляции, например, обеих цепей двцепочечного белка и белка-шаперона используют три копии индуцибельного промотора.

[0153] В некоторых вариантах реализации индуцируемый промотор является IPTG-индуцибельным промотором. IPTG-индуцибельный промотор может относиться к любой полинуклеотидной последовательности, стимулирующей транскрипцию в ответ на изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (IPTG) или другие производные лактозы, которые могут стимулировать транскрипцию *lac*-оперона (например, аллолактозу). В данной области техники известно большое количество примеров IPTG-индуцибельных промоторов, включая, без ограничения, *tac*-промоторы (например, *tacI*, *tacII* и т.д.), *lac*-промоторы и их производные (например, *lacUV5*, *taclac* и т.д.).

[0154] В некоторых вариантах реализации индуцибельный промотор является IPTG-индуцибельным промотором, запускающим транскрипцию первой цепи, второй цепи и белка-шаперона. В ходе совершения настоящего изобретения сделано неожиданное открытие, что IPTG-индуцибельный промотор, регулирующий экспрессию белка-

шаперона, может без индукции посредством IPTG стимулировать экспрессию белка-шаперона на уровне, способствующем увеличению титра продукта, по сравнению с экспрессией белка-шаперона при индукции IPTG-индуцибельного промотора посредством IPTG.

5 [0155] В некоторых вариантах реализации индуцибельный промотор является rho-промотором, запускающим транскрипцию первой цепи, второй цепи и белка-шаперона при исчерпании фосфата в культуральной среде. Pho-промотор может относиться к
любой полинуклеотидной последовательности, стимулирующей транскрипцию в ответ
10 на внеклеточный фосфат (например, неорганический фосфат). Например, фосфатный (Pho) регулон *E. coli* содержит белковые компоненты, чувствительные к внеклеточному фосфату и регулирующие экспрессию ряда нижележащих генов посредством Pho-
промоторов в ответ на уровень фосфатов (более подробное описание см. в Hsieh YJ
and Wanner BL 2010 Curr. Opin. Microbiol. 13(2):198). Известно, что при росте бактерий
15 в культуральной среде экспрессия этого Pho-регулона репрессируется при наличии в среде фосфата (например, неорганического фосфата, Pi) и индуцируется при исчерпании фосфата. Одним из неограничивающих примеров rho-промотора, используемых в
способах, описанных в настоящем документе, является rhoA-промотор *E. coli*. Этот
промотор широко известен и используется в данной области техники для регуляции
экспрессии рекомбинантных белков в прокариотических клетках-хозяевах в зависимости
20 от концентрации фосфата в культуральной среде (более подробное описание см. в Lubke C et al. 1995 Enzyme Microb. Technol. 17(10):923).

[0156] В некоторых вариантах реализации полинуклеотид дополнительно содержит селективный маркер, а культуральная среда содержит селективный агент, содержащий
один антибиотик, вызывающий сохранение полинуклеотида в клетке-хозяине.

25 Преимущество способов, описанных в настоящем документе, состоит в том, что они позволяют продуцировать цепи двуцепочечного белка с совместной экспрессией одного или более из белков-шаперонов так, что единицы трансляции, кодирующие каждый из этих компонентов, входят в состав одиночного полинуклеотида (например, плазмиды
для экспрессии или системы одиночной плазмиды, как описано в настоящем документе).
30 Преимущество такой системы состоит в том, что, поскольку все эти компоненты кодирует одна и та же плаزمида, для поддержания указанных полинуклеотидов в прокариотической клетке-хозяине требуется лишь один селективный маркер.

[0157] Селективный маркер может относиться к любому полинуклеотиду, кодирующему белок, способствующий выживанию клетки-хозяина при селекции клеток,
35 т.е. любом условии, используемом для преимущественного увеличения встречаемости клетки(ок), несущих селективный маркер, по сравнению со встречаемостью клетки(ок), не содержащих селективного маркера. Примерами селективных маркеров являются гены, способствующие выживанию клетки-хозяина в присутствии антибиотика. В
данной области техники известно большое количество селективных маркеров и
40 соответствующих селективных агентов, содержащих один антибиотик. Например, без ограничения, многие селективные маркеры и соответствующие антибиотики описаны и упомянуты в статье Jang CW and Magnuson T 2013 PLoS ONE 8(2):e57075. В некоторых
вариантах реализации селективный маркер может относиться к гену (например, гену, экспрессируемому плазмидой), восполняющему делецию гена в геноме клетки-хозяина.
45 В указанных примерах при селекции клетки (т.е. росте в условиях, требующих активности гена, удаленного из генома хозяина) копия гена, содержащаяся на плазмиде, восполняет дефект генома хозяина, тем самым обеспечивая отбор клетки(ок), несущей(их) экзогенный дополняющий ген. Такие гены могут содержать ауксотрофные маркеры

или гены, необходимых для получения конкретных питательных веществ, отсутствующих в среде для клеток, примеры которых описаны далее в настоящем документе. Некоторые типичные селективные маркеры и антибиотики дополнительно описаны ниже.

[0158] В некоторых вариантах реализации первая единица трансляции содержит первую область инициации трансляции (TIR) в функциональной комбинации с областью, кодирующей первую цепь, а вторая единица трансляции содержит вторую область инициации трансляции (TIR) в функциональной комбинации с областью, кодирующей вторую цепь. Известно, что области инициации трансляции (TIR) имеют важное значение для трансляции рекомбинантных белков в прокариотических клетках-хозяевах (см., например, Simmons LC and Yansura DG 1996 Nat. Biotechnol. 14:629 and Vimberg V et al. 2007 BMC Mol. Biol. 8:100). TIR может определять эффективность трансляции единицы трансляции. TIR обычно содержит функционал единицы трансляции, например, кодон инициации, последовательность Шайна-Дальгарно (SD) и энхансеры трансляции. TIR может дополнительно содержать сигнальную последовательность секреции, кодирующую сигнальный пептид. Последовательность и расстояние между функциональными блоками TIR может регулировать эффективность инициации трансляции.

[0159] В некоторых вариантах реализации относительная эффективность трансляции первой и второй TIR составляет от около 1,0 до около 3,0. В настоящем документе описаны векторы, содержащие единицы трансляции, кодирующие каждую цепь двуцепочечного белка, и каждая единица трансляции может содержать TIR. В настоящем документе термин «эффективность трансляции» может относиться к получению полипептида путем трансляции единицы трансляции. Эта продукция может зависеть от ряда функций, включая, без ограничения, трансляцию мРНК, стабильность мРНК, эффективность связывания рибосомы с мРНК и фолдинг, сборку и/или транслокацию кодируемого полипептида. Относительная эффективность трансляции может относиться к продукции полипептида, кодируемого единицей трансляции со специфической или экспериментальной TIR, по сравнению с продукцией полипептида, кодируемого единицей трансляции с TIR дикого типа или контрольной TIR, при экспрессии экспериментальной TIR и контрольной TIR выразили аналогичными прокариотическими клетками-хозяевами (например, относящимися к одному и тому же роду, и виду), культивируемыми в одних и тех же условиях. Дополнительное описание TIR можно найти в патенте США № 8361744.

Рекомбинантные полипептиды

[0160] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам получения полипептидов с двумя цепями. Преимущество способов, описанных в настоящем документе, состоит в том, что их можно применять для стимуляции экспрессии, фолдинга и сборки белков различного типа, особенно белков с дисульфидными связями, например, двуцепочечных белков, описанных выше. Конкретные двуцепочечные белки описаны ниже, однако способы, описанные в настоящем документе, не ограничиваются этими конкретными вариантами реализации. В настоящем документе двуцепочечные белки могут включать белки, содержащие более одной отдельной полипептидной цепи. Хотя многие варианты реализации, описанные в настоящем документе, включают двуцепочечные белки с двумя полипептидными цепями, двуцепочечные белки с более чем двумя полипептидными цепями (например, тремя или более полипептидами) рассматриваются в настоящем изобретении и могут продуцироваться посредством способов, описанных в настоящем документе. Как описано выше, двуцепочечные белки из одной полипептидной цепи, в иных условиях соединяющиеся, как если бы они являлись

двумя отдельными полипептидными цепями (например, одноцепочечные антитела, одноцепочечные вариабельные фрагменты и т.п.) также рассматриваются в настоящем изобретении и могут продуцироваться посредством способов, описанных в настоящем документе.

5 [0161] В некоторых вариантах реализации две цепи двуцепочечного полипептида связаны друг с другом по меньшей мере одной дисульфидной связью. Дисульфидная связь может относиться к любой ковалентной связи, соединяющей две тиоловые группы. Дисульфидные связи в полипептидах обычно образуются между тиоловыми группами остатков цистеина. В данной области техники известно, что полипептидные
10 дисульфидные связи имеют важное значение для фолдинга и сборки многих полипептидов, например, двуцепочечных белков согласно настоящему изобретению. Полипептидные дисульфидные связи могут включать дисульфидные связи между остатками цистеина в одной полипептидной цепи (т.е. внутримолекулярные или внутрицепочечные дисульфидные связи). Полипептидные дисульфидные связи также
15 могут включать дисульфидные связи между остатками цистеина в различных полипептидных цепях (т.е. межмолекулярные или межцепочечные дисульфидные связи). Так, в некоторых вариантах реализации две цепи двуцепочечного полипептида связаны друг с другом по меньшей мере одной дисульфидной связью.

[0162] В данной области техники известно, что дисульфидные связи имеют важное
20 значение для фолдинга и сборки антител и фрагментов антител. Известно, что различные изоформы антител и различные подклассы внутри изоформы обладают различной картиной дисульфидных связей. Например, IgG-антитела могут содержать 12 внутрицепочечных дисульфидных связей, одну межцепочечную дисульфидную связь между каждой легкой цепью и соответствующей тяжелой цепью и от 2 до 11 межцепочечных дисульфидных
25 связей между тяжелыми цепями, в зависимости от конкретного подкласса IgG (более подробное описание см. в Liu H and May K 2012 MAb. 4(1):17). Кроме того, известно, что IgM (см., например, Wiersma EJ and Shulman MJ 1995 J. Immunol. 154(10): 5265), IgE (см., например, Helm BA et al. 1991 Eur. J. Immunol. 21(6): 1543), IgA (см., например, Chintalacharuvu KR et al. 2002 J. Immunol. 169(9): 5072), и IgD (см., например, Shin SU et
30 al. 1992 Hum. Antibodies Hybridomas 3(2):65) также образуют дисульфидные связи при фолдинге и сборке.

[0163] В некоторых вариантах реализации двуцепочечный полипептид согласно настоящему изобретению является гетерологичным для клетки-хозяина. В настоящем документе термин «гетерологичный полипептид» по отношению к клетке-хозяину
35 может относиться к любому полипептиду, не экспрессирующемуся в клетке-хозяине эндогенно, т.е. при выделении клетки-хозяина из природной среды. Гетерологичный полипептид может также относиться к полипептиду, который может эндогенно экспрессироваться в клетке-хозяине, но экспрессируется под контролем иных систем регуляции, чем при выделении клетки-хозяина из природной среды. Примеры иных
40 систем регуляции могут включать, без ограничения, иное количество экспрессии, экспрессию в ответ на иные стимулы, или любые другие измененные аспекты экспрессии, например, использование гетерологичного промотора, например, индуцибельного промотора.

[0164] В некоторых вариантах реализации двуцепочечный полипептид согласно
45 настоящему изобретению является мономером гетеродимера. В настоящем документе гетеродимер может относиться к любому полипептидному комплексу, содержащему два функционально связанных различных полипептида или полипептидных комплекса. Неограничивающий пример гетеродимера представляет собой биспецифическое или

двухвалентное антитело, состоящее из двух различных мономеров антител (т.е. функционально связанных пар «легкая цепь-тяжелая цепь»). В этом примере фолдинг и сборка первой пары «тяжелая цепь - легкая цепь», распознающей первый антиген, позволяют получить первый мономер антитела. Фолдинг и сборка второй пары «тяжелая цепь - легкая цепь», распознающей второй антиген, позволяют получить второй мономер антитела. Эти мономеры можно собрать любыми средствами, известными в данной области техники (подробнее описанными ниже по отношению к биспецифическим антителам) с образованием гетеродимера. Более подробную информацию о наглядном примере образования гетеродимерного антитела см. в статье Ridgway JBB et al. 1996 Protein Eng. 9(7):617.

[0165] В некоторых вариантах реализации двуцепочечный полипептид согласно настоящему изобретению представляет собой одновалентное антитело, причем первая цепь и вторая цепь представляют собой тяжелую цепь иммуноглобулина и легкую цепь иммуноглобулина. В настоящем документе одновалентное антитело может относиться к любому полипептидному комплексу из тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, функционально связанных с образованием пары «тяжелая цепь - легкая цепь», причем указанная пара «тяжелая цепь - легкая цепь» не находится в функциональной взаимосвязи с второй парой «тяжелая цепь - легкая цепь». На равных основаниях в настоящем документе можно использовать термин «полуантитело (пАт)».

[0166] В некоторых вариантах реализации одновалентное антитело согласно настоящему изобретению способно специфически связывать антиген. В настоящем документе термин «связывает», «специфически связывающий» или «специфичный по отношению к» относится к измеряемым и воспроизводимым взаимодействиям, например, связыванию между мишенью (т.е. и антителом, что является указанием на наличие мишени в присутствии гетерогенной популяции молекул, включая биологические молекулы. Например, антитело, связывающееся с или специфически связывающееся с мишенью (которая может представлять собой эпитоп), представляет собой антитело, связывающее эту мишень с большим сродством, авидностью, более легко и/или на больший срок, чем оно связывается с другими мишенями. В одном варианте реализации степень связывания антитела с неспецифической мишенью составляет менее около 10% связывания антитела с мишенью при измерении, например, с помощью радиоиммуноанализа (РИА). В некоторых вариантах реализации антитело, специфически связывающееся с мишенью, обладает константой диссоциации (K_d) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ или $\leq 0,1$ нМ. В некоторых вариантах реализации антитело специфически связывается с эпитопом белка, который является консервативным среди белков различных видов животных. В еще одном варианте реализации специфическое связывание может включать эксклюзивное связывание, но не требует его.

[0167] В некоторых вариантах реализации двуцепочечный полипептид согласно настоящему изобретению является секреторным белком. В настоящем документе секреторный белок может относиться к любому белку, секретируемому клеткой-хозяином в периплазму клетки-хозяина или во внеклеточное окружение. Секреторный белок может представлять собой белок, эндогенно секретируемый клеткой-хозяином, или секреторный белок может представлять собой белок, не секретируемый эндогенно клеткой-хозяином, но модифицируемый таким образом, что это способствует его секреции. Например, присутствие сигнальной последовательности, обычно находящейся на N-конце полипептида, может активировать секреторный путь для секреции полипептида. В данной области техники известно большое количество сигнальных последовательностей, которые можно применять для стимуляции секреции секреторного

белка или активации секреции белка, в естественных условиях не секретируемого клеткой-хозяином; см., например, Immun. 42:269-275 (1983); Simmons and Yansura, Nature Biotechnology 14:629-634 (1996); и Humphreys DP et al. 2000 Protein Expr. Purif. 20(2):252.

Одним неограничивающим примером сигнальной последовательности является сигнальная последовательность термостабильного энтеротоксина II (STII).

[0168] В некоторых вариантах реализации двухцепочечный полипептид согласно настоящему изобретению представляет собой иммуномобилизующий моноклональный Т-клеточный рецептор против рака (ImmTAC). ImmTAC может относиться к слитому белку, объединяющему фрагмент одноцепочечного антитела против CD3 (или аналогичный фрагмент антитела, который связывает Т-клетку и активирует Т-клеточный ответ) с растворимым моноклональным Т-клеточным рецептором (TCR). В некоторых вариантах реализации растворимый моноклональный TCR ImmTAC может быть модифицирован так, чтобы обладать повышенным сродством к конкретному антигену по сравнению со сродством к антигену TCR, который не был модифицирован (например, природный TCR). ImmTAC можно использовать для ряда применений, включая, без ограничений, активацию ответа Т-клеток на клетку, такую как опухолевая клетка, представляющая родственный антиген, распознаваемый ImmTAC. В некоторых вариантах реализации растворимый моноклональный TCR содержит варибельный домен альфа-цепи TCR и варибельный домен бета-цепи TCR. В некоторых вариантах реализации растворимый моноклональный TCR дополнительно содержит константный домен альфа-цепи TCR и константный домен бета-цепи TCR, связанный при помощи нативной или ненативной дисульфидной связи. Более подробное описание ImmTAC см., например, в патенте США № 7569664; Liddy et al., Nat. Med. 18:908-7 (2012); и Oates and Jakobsen, OncoImmunology 2:e22891 (2013).

[0169] В некоторых вариантах реализации секреторный белок выделяют из периплазмы клетки-хозяина. В данной области техники периплазма относится к пространству между внутренней или цитоплазматической мембраной и внешней мембраной грамотрицательной бактериальной клетки. Безотносительно к теоретическим представлениям считается, что периплазма является окислительной средой, способствующей образованию дисульфидных связей. Поэтому локализация полипептида с дисульфидными связями в составе его правильно уложенной и собранной структуры (например, двуцепочечного белка согласно настоящему изобретению) в периплазме может быть выгодной (более подробное описание см. в статье Schlapschy M et al. 2006 Protein Eng. Des. Sel. 19(8):385).

[0170] В данной области техники известно большое количество способов выделения периплазматического белка. Один из неограничивающих примеров крупномасштабной очистки периплазматических белков описан в Европейском патенте № EP1356052 B1 (см., например, пример 4). Периплазматические белки можно выделить путем экстракции периплазматической фракции из препарата сферобластов (см., например, Schlapschy M et al. 2006 Protein Eng. Des. Sel. 19(8):385). После получения периплазматического экстракта можно выполнить очистку периплазматических белков с помощью любого стандартного способа очистки белка, известного в данной области техники, например, аффинной очистки, хроматографии и т.п.

Антитела

[0171] Двуцепочечные белки, описанные в настоящем документе, можно получить любым подходящим способом, известным в данной области техники. Одним из типичных классов двуцепочечных белков являются антитела. Как описано ниже, антитела получают с использованием способов получения антител, доступных в данной области

техники, причем типичные способы подробнее описаны в следующих разделах. Специалист в данной области техники должен понимать, что многие из описанных ниже способов могут быть применимы к двуцепочечным белкам, не являющимися антителами.

5 [0172] Антитела против исследуемого антигена (например, без ограничения, PD-L1 (например, PD-L1 человека), HER2 или CD3 (например, CD3 человека), ИЛ-13, ИЛ-4, VEGFC, VEGFA и VEGF). Предпочтительно, антиген представляет собой биологически важный полипептид, и введение антитела млекопитающему, страдающему от расстройства, может привести к терапевтическому благоприятному эффекту у этого
10 млекопитающего.

[0173] В некоторых вариантах реализации антитело, предложенное в настоящем документе, обладает константой диссоциации (K_d), составляющей ≤ 1 мкМ, ≤ 150 нМ, ≤ 100 нМ, ≤ 50 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ или $\leq 0,001$ нМ, (например, 10^{-8} М или менее, например, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например, от 10^{-9} М до 10^{-13} М).

15 [0174] В одном варианте реализации K_d измеряют с помощью анализа связывания антигена, меченного радиоактивной меткой (РИА), выполняемого с использованием Fab-версии исследуемого антитела и его антигена, как описано в следующем анализе. Сродство связывания Fab с антигеном в растворе измеряют путем уравнивания
20 Fab с минимальной концентрацией (^{125}I)-меченого антигена в присутствии серии разведений немеченого антигена, с последующим захватом связанного антигена с помощью планшета с иммобилизованным антителом против Fab (см., например, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Для определения условий анализа многолуночные планшеты MICROTITER[®] (Thermo Scientific) покрывали в течение ночи 5 мкг/мл антитела
25 для захвата Fab (Cappel Labs) в 50 мМ растворе карбоната натрия (pH 9,6), и затем блокировали 2% (масс/об) раствором бычьего сывороточного альбумина в PBS в течение двух - пяти часов при комнатной температуре (приблизительно 23°C). В неадсорбирующем планшете (Nunc № 269620) смешивают 100 пМ или 26 пМ [^{125}I]-
30 антигена с последовательно разбавленными растворами исследуемого Fab. Затем исследуемый Fab инкубируют в течение ночи; в то же время инкубирование можно продолжать в течение более длительного периода (например, около 65 часов) для гарантии достижения равновесия. Затем смесь переносят на планшет для захвата и инкубируют при комнатной температуре (например, в течение часа). Затем удаляют
35 раствор и восьмикратно промывают планшет 0,1% полисорбатом-20 (TWEEN-20[®]) в PBS. После высушивания планшетов добавляют 150 мкл сцинтиллятора (MICROSCINT-20[™], Packard) на лунку и производят подсчет планшетов на гамма-счетчике TOPCOUNT[™] (Packard) в течение десяти минут. Концентрации каждого Fab, обеспечивавшие связывание, меньшее или равное 20% от максимального, отбирают для применения в
40 конкурентном анализе связывания.

[0175] Согласно еще одному варианту реализации, K_d измеряют с помощью анализа на основе поверхностного плазмонного резонанса с использованием BIACORE[®]-2000 или BIACORE[®]-3000 (BIAcore, Inc., Пискатауэй, штат Нью-Джерси) при 25°C с чипами
45 CM5 с иммобилизованным антигеном при ~10 единицах ответа (RU). Вкратце, чипы биосенсора с карбоксиметилированным декстраном (CM5, BIACORE, Inc.) активировали N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)-карбодиимидгидрохлоридом (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) согласно инструкциям поставщика. Антиген разбавляют

10 мМ раствором ацетата натрия, pH 4.8, до 5 мкг/мл (~0,2 мМ) и вводят при скорости потока 5 мкл/минуту, до достижения приблизительно 10 единиц ответа (RU) связанного белка. После введения антигена вводят 1 М раствор этаноламина для блокирования непрореагировавших групп. Для измерений кинетики двукратные серийные разведения Fab (от 0,78 нМ до 500 нМ) вводят в PBS с 0,05% поверхностно-активным веществом полисорбатом-20 (Tween-20TM) (PBST) при 25°C при скорости потока приблизительно 25 мкл/мин. Скорости ассоциации (k_{on}) и диссоциации (k_{off}) рассчитывали с помощью простейшей модели связывания Ленгмюра при соотношении один к одному

(программное обеспечение BIACORE[®] Evaluation Software версии 3.2) путем одновременной аппроксимации сенсограмм ассоциации и диссоциации. Равновесную константу диссоциации (K_d) рассчитывали как отношение k_{off}/k_{on} . См., например, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). Если скорость ассоциации согласно вышеописанному анализу поверхностного плазмонного резонанса превышает $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, то ее можно определить с помощью методики гашения флуоресценции, измеряющей увеличение или снижение интенсивности испускания флуоресценции (возбуждение=295 нм; испускание=340 нм, полоса пропускания 16 нм) при 25°C для 20 нМ раствора антител против антигена (в форме Fab) в PBS, pH 7.2, в присутствии возрастающих концентраций антигена, измеренных на спектрометре, например, на спектрофотометре с устройством остановки потока (Aviv Instruments) или спектрофотометре SLM-AMINCOTM 8000 серии (ThermoSpectronic) с перемешиваемой кюветой.

(i) Получение антигена

[0176] Растворимые антигены или их фрагменты, необязательно конъюгированные с другими молекулами, можно использовать в качестве иммуногенов для создания антител. Для трансмембранных молекул, например, рецепторов, в качестве иммуногена можно использовать их фрагменты (например, внеклеточный домен рецептора). Кроме того, в качестве иммуногена можно использовать клетки, экспрессирующие трансмембранную молекулу. Такие клетки могут происходить из природного источника (например, раковых линий клеток) или представлять собой клетки, трансформированные с помощью рекомбинантных методик с целью экспрессии трансмембранной молекулы. Другие антигены и их формы, которые можно применять для получения антител, очевидны для специалистов в данной области техники.

(ii) Некоторые способы на основе антител

[0177] Поликлональные антитела предпочтительно получают в организме животных посредством нескольких подкожных (п/к) или внутрибрюшинных (в/б) инъекций соответствующего антигена и адъюванта. Можно использовать конъюгирование соответствующего антигена с белком, иммуногенным для иммунизируемых видов, например, гемоцианин лимфы *Megathura crenulata*, сывороточный альбумин, тиреоглобулин КРС или ингибитор трипсина сои с использованием бифункционального или модифицирующего агента, например, малеимидбензоилсульфосукцинимидного эфира (конъюгирование через остатки цистеина), N-гидроксисукцинимид (через остатки лизина), глутаральдегида, ангидрида янтарной кислоты SOCl_2 или $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, где R и R^1 представляют собой различные алкильные группы.

[0178] Животных иммунизируют против желаемого антигена, иммуногенных конъюгатов или производных путем объединения, например, 100 мкг или 5 мкг белка или конъюгата (для кроликов и мышей, соответственно) с 3 объемами полного адъюванта Фрейнда и интрадермальной инъекции раствора в несколько областей.

Спустя месяц животных стимулируют с использованием от 1/5 до 1/10 от исходного количества пептида или конъюгата в полном адъюванте Фрейнда путем подкожной инъекции в несколько областей. Спустя интервал времени от семи до 14 суток у животных проводят пробоотбор крови и анализируют титр антител в сыворотке.

- 5 Животных стимулируют до достижения постоянного уровня титра. Предпочтительно, животное стимулируют конъюгатом того же антигена, но конъюгированного с другим белком и/или посредством другого перекрестно связывающего реагента. Конъюгаты также можно получить в рекомбинантной клеточной культуре в виде гибридных белков. Кроме того, для усиления иммунного ответа используют агрегирующие агенты, например, квасцы.

- 10 [0179] Моноклональные антитела согласно настоящему изобретению можно получить с использованием гибридного способа, впервые описанного в статье Kohler *et al.*, Nature, 256:495 (1975) и более подробно описанного по отношению к гибриdomам человека-человека, например, в Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling *et al.*, in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981), и Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006). Дополнительные способы включают способы, описанные, например, в патенте США № 7189826 относительно получения моноклональных природных IgM-антител человека в гибридных линиях клеток.
- 15 20 Технология на основе гибриdomы человека (Trioma technology) также описана в статьях Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3): 927-937 (2005) и Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3): 185-91 (2005). После выделения желательных моноклональных антител из гибриdom можно клонировать полинуклеотиды, кодирующие их, в прокариотическом векторе для экспрессии, и продуцировать антитела путем экспрессии в прокариотической клетке-хозяине любым из способов, описанных в настоящем документе.

(iii) Антитела, полученные из библиотек

- [0180] Антитело согласно настоящему изобретению можно выделить путем скрининга комбинаторных библиотек на предмет антител с желательной активностью или активностями. Например, в данной области техники известны различные способы получения библиотек фагового дисплея и скрининг таких библиотек на предмет антител, обладающих желательными характеристиками связывания, например, способы, описанные в примере 3. Дополнительные способы рассмотрены, например, в публикации Hoogenboom *et al.* в *Methods in Molecular Biology* 178: 1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) и дополнительно описаны, например, в статьях McCafferty *et al.*, *Nature* 348: 552-554; Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, в *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); и Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004).

- [0181] В некоторых способах на основе фагового дисплея репертуары VH- и VL-генов по отдельности клонируют посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) и случайным образом рекомбинируют в фаговых библиотеках, которые затем можно подвергать скринингу на предмет антигенсвязывающего фага, как описано в статье Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Фаг обычно отображает фрагменты антитела в виде одноцепочечных Fv-фрагментов (scFv) или Fab-фрагментов. Библиотеки из иммунизированных источников позволяют получить антитела с высокой аффинностью к иммуногену без необходимости конструирования гибриdom. В качестве

альтернативы, можно клонировать наивный репертуар (например, человека) для получения единого источника антител к широкому спектру чужеродных антигенов и аутоантигенов без иммунизации, как описано в статье Griffiths et al., *EMBO J*, 12: 725-734 (1993). Наконец, наивные библиотеки можно также получить путем синтеза,
 5 клонируя сегменты V-генов стволовых клеток, не подвергавшиеся реаранжировке, и используя ПЦР-праймеры, содержащие случайные последовательности, для кодирования гипервариабельной области CDR3 и осуществления реаранжировки *in vitro*, как описано в статье Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Патентные публикации, в которых описаны фаговые библиотеки человеческих антител, включают, например,
 10 патент США №5750373 и патентные публикации США №2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 и 2009/0002360.

[0182] Антитела или фрагменты антител, выделенные из библиотек антител человека, в настоящем документе считаются антителами человека или фрагментами антител человека.

15 (iv) Химерные, гуманизированные антитела и антитела человека

[0183] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело, предложенное в настоящем документе, представляет собой химерное антитело. Некоторые химерные антитела описаны, например, в патенте США №4816567; и Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). В одном примере химерное антитело содержит
 20 вариабельную область нечеловеческого происхождения (например, вариабельную область, происходящую от антитела мыши, крысы, хомяка, кролика или нечеловекообразного примата, например, обезьяны) и константную область человека. В еще одном примере химерное антитело представляет собой антитело с "переключенным классом", в котором изменен класс или подкласс по сравнению с
 25 родительским антителом. Термин "химерные антитела" включает антигенсвязывающие фрагменты таких антител.

[0184] В некоторых вариантах реализации химерное антитело является гуманизированным антителом. Как правило, антитело нечеловеческого происхождения гуманизируют с целью снижения иммуногенности для человека, сохраняя при этом
 30 специфичность и аффинность родительского антитела нечеловеческого происхождения. Как правило, гуманизированное антитело содержит один или более вариабельных доменов, в которых HVR, например, CDR (или их фрагменты) происходят от антитела нечеловеческого происхождения, и FR (или их фрагменты) происходят от последовательностей антитела человека. В некоторых случаях гуманизированное
 35 антитело также может содержать по меньшей мере фрагмент константной области антитела человека. В некоторых вариантах реализации некоторые FR-остатки в гуманизированном антителе заменяют соответствующими остатками антитела нечеловеческого происхождения (например, антитела, из которого получены остатки HVR), например, с целью восстановления или улучшения специфичности или сродства
 40 антитела.

[0185] Гуманизированные антитела и способы их изготовления рассмотрены, например, в публикациях Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), и дополнительно описаны, например, в статьях Riechmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033 (1989); патентах США №5821337,
 45 7527791, 6982321 и 7087409; Kashmiri et al., *Methods* 36: 25-34 (2005) (где описана пересадка SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28: 489-498 (1991) (где описано "изменение поверхности"); Dall'Acqua et al., *Methods* 36: 43-60 (2005) (где описана "перетасовка FR"); и Osbourn et al., *Methods* 36: 61-68 (2005) и Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83: 252-260 (2000)

(где описан подход "направленного отбора" к перетасовке FR).

[0186] Каркасные области человека, которые можно использовать для гуманизации, включают: каркасные области, выбранные с помощью методики «наилучшего соответствия» (см., например, Sims et al. *J. Immunol.* 151: 2296 (1993)); каркасные области, происходящие от консенсусной последовательности антител человека конкретной подгруппы вариабельных областей легкой или тяжелой цепи (см., например, Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); и Presta et al. *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)); зрелые (содержащие соматические мутации) каркасные области человека или эмбриональные каркасные области человека (см., например, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13: 1619-1633 (2008)); и каркасные области, полученные при скрининге библиотек FR (см., например, Vasa et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) и Rosok et al., *Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

[0187] В некоторых вариантах реализации антитела, предложенное в настоящем документе, представляет собой антитело человека. Антитела человека можно получить, используя различные методики, известные в данной области техники. Антитела человека в общих чертах описаны в статьях van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) и Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008). Антитела человека можно получить, например, без ограничения, путем экспрессии в прокариотической клетке-хозяине с прокариотического экспрессирующего вектора любым из способов, описанных в настоящем документе.

[0188] Человеческие антитела также можно получить путем выделения Fv-клона последовательностей вариабельного домена, выбранных из библиотек фагового дисплея человеческого происхождения. Такие последовательности вариабельного домена затем можно объединять с желательными константными доменами человека. Методики отбора антител человека из библиотек антител описаны ниже.

(v) Фрагменты антител

[0189] Фрагменты антител можно получить традиционными средствами, например, ферментативным гидролизом, или с использованием рекомбинантных методик. В определенных обстоятельствах есть преимущества в использовании фрагментов антитела, а не целых антител. Меньший размер фрагментов обеспечивает быстрый клиренс и может привести к улучшению доступа к плотным опухолям. Обзор некоторых фрагментов антител см. в статье Hudson et al. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134.

[0190] Для получения фрагментов антител разработаны различные методики. Традиционно эти фрагменты получали протеолитическим гидролизом интактных антител (см., например, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992); и Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)). Однако в настоящее время эти фрагменты можно получать напрямую с помощью рекомбинантных клеток-хозяев. Фрагменты антител Fab, Fv и ScFv можно экспрессировать и секретировать с помощью *E. coli*, таким образом обеспечивая легкое получение больших количеств этих фрагментов. Фрагменты антител можно выделить из фаговых библиотек антител, обсуждавшихся выше. В альтернативном варианте фрагменты Fab'-SH могут быть непосредственно извлечены из клеток *E. coli* и химически связаны с образованием фрагментами F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). В соответствии с другим подходом, фрагменты F(ab')₂ могут быть выделены непосредственно из культуры рекомбинантных клеток хозяев. Fab- и F(ab')₂-фрагменты с повышенным временем полужизни *in vivo*, содержащие остатки эпитопа связывания рецептора реутилизации, описаны в патенте США № 5869046. Другие методики получения фрагментов антител

очевидны для специалиста. В некоторых вариантах реализации антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv). См. WO 93/16185; патенты США № 5571894 и 5587458. Fv- и scFv-фрагменты являются единственными разновидностями с интактными сайтами объединения, лишенными константных областей; таким образом, их можно применять для снижения неспецифического связывания при использовании *in vivo*. Можно сконструировать гибридные белки scFv для объединения с эффекторным белком по N- или C-концу scFv. См. *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, *supra*. Фрагмент антитела также может представлять собой "линейное антитело", например, описанное в патенте США № 5641870. Такие линейные антитела могут быть моноспецифическими или биспецифическими.

(vi) Полиспецифические антитела

[0191] Полиспецифические антитела обладают специфичностью связывания с по меньшей мере двумя различными эпитопами, причем указанные эпитопы обычно получены из различных антигенов. Хотя обычно такие молекулы связывают лишь два различных эпитопа (т.е. являются биспецифическими антителами, BsAb), антитела с дополнительной специфичностью, например, триспецифические антитела, также входят в рамки данного выражения при употреблении в настоящем документе. Биспецифические антитела можно получить в виде полноразмерных антител или фрагментов антител (например, F(ab')₂-биспецифических антител).

[0192] В данной области техники известны способы изготовления биспецифических антител. Традиционное получение полноразмерных биспецифических антител основано на совместной экспрессии двух пар «тяжелая цепь - легкая цепь» иммуноглобулина, причем указанные две цепи характеризуются различной специфичностью (Millstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)). Из-за случайного ассортимента тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов эти гибридомы (квадромы) продуцируют потенциальную смесь 10 различных молекул антител, из которых только одна обладает правильной биспецифической структурой. Очистка правильной молекулы, которую обычно выполняют на этапе аффинной хроматографии, является довольно трудоемкой, и выход продукта низок. Аналогичные процедуры описаны в WO 93/08829 и в статье Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

[0193] Один подход к получению биспецифических антител, известный в данной области техники, представляет собой подход «выступ-во-впадину» или «выпуклость-в-полость» (см., например, патент США № 5731168). В этом подходе каждый из двух иммуноглобулиновых полипептидов (например, полипептидов тяжелых цепей) образует интерфейс. Интерфейс одного иммуноглобулинового полипептида взаимодействует с соответствующим интерфейсом другого иммуноглобулинового полипептида, тем самым обеспечивая связывание двух иммуноглобулиновых полипептидов. Эти интерфейсы можно спроектировать таким образом, что «выступ» или «выпуклость» (эти термины можно использовать в настоящем документе на равных основаниях), расположенный в интерфейсе одного иммуноглобулинового полипептида, соответствует «впадине» или «полости» (эти термины можно использовать в настоящем документе на равных основаниях), расположенной в интерфейсе другого иммуноглобулинового полипептида. В некоторых вариантах реализации впадина обладает идентичным или аналогичным размером по отношению к выступу и располагается таким образом, что при взаимодействии двух интерфейсов выступ одного интерфейса можно поместить в соответствующую впадину другого интерфейса. Безотносительно к теоретическим представлениям, считается, что это стабилизирует гетеромультимер и способствует образованию гетеромультимера по сравнению с другими разновидностями, например,

гомомультимерами. В некоторых вариантах реализации этот подход можно использовать для стимуляции гетеромультимеризации двух различных иммуноглобулиновых полипептидов с образованием биспецифических антител, содержащих два иммуноглобулиновых полипептида со специфичностью связывания с различными эпитопами.

[0194] В некоторых вариантах реализации выступ можно сконструировать путем замены небольшой боковой цепи аминокислоты боковой цепью большего размера. В некоторых вариантах реализации впадину можно сконструировать путем замены крупной боковой цепи аминокислоты боковой цепью меньшего размера. Выступы или впадины могут присутствовать в исходном интерфейсе, или их можно внедрить синтетически. Например, выступы или впадины можно внедрить синтетически путем изменения нуклеотидной последовательности, кодирующей интерфейс, с целью замены по меньшей мере одного «исходного» аминокислотного остатка по меньшей мере одним «импортированным» аминокислотным остатком. Способы изменения нуклеотидных последовательностей могут включать стандартные молекулярно-биологические методики, хорошо известные в данной области техники. В следующей таблице показан объем боковой цепи различных аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации исходные остатки содержат боковую цепь небольшого объема (например, аланин, аспарагин, аспарагиновая кислота, глицин, серин, треонин или валин), а импортируемые для образования выступа остатки являются естественными аминокислотами и могут включать аргинин, фенилаланин, тирозин и триптофан. В некоторых вариантах реализации исходные остатки содержат боковую цепь большого объема (например, аргинин, фенилаланин, тирозин и триптофан), а импортируемые для образования впадины остатки являются естественными аминокислотами и могут включать аланин, серин, треонин или валин.

Таблица 1b. Свойства аминокислотных остатков

Аминокислота	Однобуквен-ное сокра-щенное название	Масса ^a (да́льтон)	Объем ^b (Å ³)	Доступная площадь поверхности ^c (Å ²)
Аланин (Ala)	A	71,08	88,6	115
Аргинин (Arg)	R	156,20	173,4	225
Аспарагин (Asn)	N	114,11	117,7	160
Аспарагиновая кислота (Asp)	D	115,09	111,1	150
Цистеин (Cys)	C	103,14	108,5	135
Глутамин (Gln)	Q	128,14	143,9	180
Глутаминовая кислота (Glu)	E	129,12	138,4	190
Глицин (Gly)	G	57,06	60,1	75
Гистидин (His)	H	137,15	153,2	195
Изолейцин (Ile)	I	113,17	166,7	175
Лейцин (Leu)	L	113,17	166,7	170
Лизин (Lys)	K	128,18	168,6	200
Метионин (Met)	M	131,21	162,9	185
Фенилаланин (Phe)	F	147,18	189,9	210
Пролин (Pro)	P	97,12	122,7	145
Серин (Ser)	S	87,08	89,0	115
Треонин (Thr)	T	101,11	116,1	140
Триптофан (Trp)	W	186,21	227,8	255
Тирозин (Tyr)	Y	163,18	193,6	230
Валин (Val)	V	99,14	140,0	155

^aМолекулярная масса аминокислоты за вычетом молекулярной массы воды. Значения

из Handbook of Chemistry and Physics, 43rd ed. Cleveland, Chemical Rubber Publishing Co., 1961.

^bЗначения из A. A. Zamyatnin, Prog. Biophys. Mol. Biol. 24:107-123, 1972.

^cЗначения из C. Chothia, J. Mol. Biol. 105:1-14, 1975. Доступная площадь поверхности определена на фигурах 6-20 данного источника.

[0195] В некоторых вариантах реализации исходные остатки для образования выступа или впадины определяют на основе трехмерной структуры гетеромультимера. Методики, известные в данной области техники для получения трехмерной структуры, могут включать рентгеноструктурный анализ и ЯМР. В некоторых вариантах реализации интерфейс представляет собой СНЗ-домен константного домена иммуноглобулина. В этих вариантах реализации СНЗ/СНЗ интерфейс IgG₁ человека включает шестнадцать остатков на каждом домене, расположенные на четырех антипараллельных β-цепях. Безотносительно к теоретическим представлениям, мутированные остатки предпочтительно располагают на двух центральных антипараллельных β-цепях с целью минимизации риска взаимодействия выступов с окружающим растворителем, а не компенсаторными впадинами в СНЗ-доме партнера. В некоторых вариантах реализации мутации, образующие соответствующие выступы и впадины в двух иммуноглобулиновых полипептидах, соответствуют одной или нескольким парам, приведенным в следующей таблице.

Таблица 2. Типичные наборы соответствующих мутаций, образующих выступы и впадины

СНЗ первого иммуноглобулина	СНЗ второго иммуноглобулина
T366Y	Y407T
T366W	Y407A
F405A	T394W
Y407T	T366Y
T366Y:F405A	T394W:Y407T
T366W:F405W	T394S:Y407A
F405W:Y407A	T366W:T394S
F405W	T394S

Мутации обозначают по исходному остатку, затем указывают положения согласно системе нумерации Кабата, а затем импортируемый остаток (все остатки приведены в виде однобуквенных обозначений аминокислот). Множественные мутации разделяют двоеточием.

[0196] В некоторых вариантах реализации иммуноглобулиновый полипептид содержит СНЗ-домен, содержащий одну или более из аминокислотных замен, перечисленных выше в таблице 2. В некоторых вариантах реализации биспецифическое антитело содержит первый иммуноглобулиновый полипептид, содержащий СНЗ-домен, содержащий одну или более из аминокислотных замен, перечисленных в левом столбце таблицы 2, и второй иммуноглобулиновый полипептид, содержащий СНЗ-домен, содержащий одну или более из соответствующих аминокислотных замен, перечисленных в правом столбце таблицы 2.

[0197] После мутации ДНК, обсуждавшейся выше, полинуклеотиды, кодирующие моифицированные иммуноглобулиновые полипептиды с одной или более из соответствующих мутаций, образующих выступ или впадину, можно экспрессировать и очистить с помощью стандартных рекомбинантных методик и клеточных систем, известных в данной области техники. См., например, патенты США № 5731168; 5807706;

5821333; 7642228; 7695936; 8216805; публикацию патента США № 2013/0089553; и Spiess et al., *Nature Biotechnology* 31: 753-758, 2013. Модифицированные иммуноглобулиновые полипептиды можно продуцировать с использованием прокариотических клеток-хозяев, например, *E. coli*. Соответствующие иммуноглобулиновые полипептиды, несущие

5 выступы и впадины, можно экспрессировать в клетках-хозяевах в совместной культуре и выделять совместно в виде гетеромультимера, или их можно экспрессировать в одиночных культурах, выделять по отдельности и собирать *in vitro*. В некоторых вариантах реализации два штамма бактериальных клеток-хозяев (один из которых экспрессирует иммуноглобулиновый полипептид с выступом, а другой экспрессирует

10 иммуноглобулиновый полипептид со впадиной) совместно культивируют с использованием стандартных методик культивирования бактерий, известных в данной области техники. В некоторых вариантах реализации указанные два штамма можно смешать в определенном соотношении, например, чтобы добиться равного уровня экспрессии в культуре. В некоторых вариантах реализации указанные два штамма

15 можно смешать в соотношении 50:50, 60:40 или 70:30. После экспрессии полипептида клетки можно совместно лизировать и выделить белок. Стандартные методики, известные в данной области техники, позволяющие измерить частоту встречаемости гомомультимерных разновидностей по сравнению с гетеромультимерными, могут включать эксклюзионную хроматографию. В некоторых вариантах реализации каждый

20 модифицированный иммуноглобулиновый полипептид экспрессируют отдельно с помощью стандартных рекомбинантных методик, и они могут быть собраны *in vitro*. Сборку можно осуществить, например, путем очистки каждого модифицированного иммуноглобулинового полипептида, их смешивания и совместного инкубирования в равном массовом соотношении, восстановления дисульфидов (например, посредством

25 обработки дитиотрейтолом), концентрирования и повторного окисления полипептидов. Образованные биспецифические антитела можно очистить с помощью стандартных методик, включая катионообменную хроматографию, и измерить с использованием стандартных методик, включая эксклюзионную хроматографию. Более подробное описание этих способов см. в Speiss et al., *Nat Biotechnol* 31:753-8, 2013. В некоторых

30 вариантах реализации модифицированные полипептиды иммуноглобулина могут быть экспрессированы отдельно в клетках СНО и собраны *in vitro* с использованием способов, описанных выше.

[0198] В соответствии с другим подходом, переменные домены антитела с желательной специфичностью связывания (сайтами связывания антитело-антиген)

35 объединяют в последовательности константных доменов иммуноглобулинов. Объединение предпочтительно осуществляют с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащим по меньшей мере шарнирной области, СН2- и СН3-области. В обычном случае по меньшей мере в одном из гибридов присутствует первая константная область тяжелой цепи (СН1) содержащая сайт, необходимый для связывания

40 легкой цепи. ДНК, кодирующие гибриды тяжелых цепей иммуноглобулинов и, при желании, легкие цепи иммуноглобулинов, внедряют в отдельные экспрессирующие векторы и совместно трансфицируют в организм подходящего хозяина. Это обеспечивает большую гибкость при коррекции взаимного соотношения трех полипептидных фрагментов в вариантах реализации, когда неравное соотношение трех полипептидных

45 цепей, используемых в конструкте, обеспечивает оптимальный выход. В то же время можно вставить кодирующие последовательности двух или всех трех полипептидных цепей в один экспрессирующий вектор, если экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в равных соотношениях приводит к высокому выходу или если

их соотношение не имеет особого значения.

[0199] В одном варианте реализации этого подхода биспецифические антитела состоят из гибридной тяжелой цепи иммуноглобулина с первой специфичностью связывания на одном плече и пары «гибридная тяжелая цепь иммуноглобулина - легкая цепь» (обеспечивающей вторую специфичность связывания) на другом плече. Установлено, что эта асимметричная структура облегчает разделение желательного биспецифического соединения и нежелательных комбинаций цепей иммуноглобулина, поскольку присутствие легкой цепи иммуноглобулина только в одной половине биспецифической молекулы обеспечивает простой способ разделения. Этот подход описан в WO 94/04690. Для получения более подробной информации о получении биспецифических антител см., например, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

[0200] В соответствии с еще одним подходом, описанным в WO96/27011, интерфейс между парой молекул антитела можно сконструировать с целью максимального увеличения доли гетеродимеров при выделении из рекомбинантной клеточной культуры. Один интерфейс содержит по меньшей мере часть C_H3-домена константного домена антитела. В этом способе одну или более из аминокислот с небольшой боковой цепью в области интерфейса первой молекулы антитела заменяют аминокислотой с боковой цепью большего размера (например, тирозином и триптофаном). Компенсаторную «полость» размера, идентичного или аналогичного крупной боковой цепи, создают в области интерфейса второй молекулы антитела, заменяя аминокислоты крупными боковыми цепями на аминокислоты с боковыми цепями меньшего размера (например, аланин или треонин). Это обеспечивает механизм повышения выхода гетеродимера по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами, например, гомодимерами.

[0201] Биспецифические антитела включают перекрестно связанные или «гетероконъюгатные» антитела. Например, одно из антител в составе гетероконъюгата можно связать с авидином, а другое - с биотином. Такие антитела, например, предложены для нацеливания клеток иммунной системы на нежелательные клетки (патент США № 4676980) и для лечения ВИЧ-инфекции (WO 91/00360, WO 92/200373 и EP 03089). Гетероконъюгатные антитела можно получить с использованием любого удобного способа перекрестного связывания. Подходящие перекрестно связывающие агенты хорошо известны в данной области техники и описаны в патенте США № 4676980, наряду с рядом методик перекрестного связывания.

[0202] Методики получения биспецифических антител из фрагментов антитела также описаны в литературе. Например, можно получить биспецифические антитела за счет химических связей. Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985) описана процедура, при которой интактные антитела протеолитически расщепляют, получая F(ab')₂-фрагменты. Эти фрагменты восстанавливают в присутствии арсенита натрия, образующего комплексы с дитиолами, для стабилизации смежных дитиолов и предотвращения образования межмолекулярных дисульфидных связей. Полученные Fab'-фрагменты затем преобразуют в производные тионитробензоата (ТНБ). Одно из Fab'-ТНБ-производных затем преобразуют в Fab'-тиол путем восстановления меркаптоэтиламиноом и смешивают с эквимоллярным количеством другого Fab'-ТНБ-производного с образованием биспецифического антитела. Полученные биспецифические антитела можно использовать в качестве агентов для селективной иммобилизации ферментов.

[0203] Недавний прогресс облегчил прямое выделение из *E. coli* Fab'-SH фрагментов, которые можно химически соединять с образованием биспецифических антител. В статье Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) описано получение молекул

полностью гуманизированного биспецифического $F(ab')_2$ -антитела. Каждый Fab' -фрагмент отдельно секретировали из *E. coli* и подвергали направленному химическому присоединению *in vitro* с образованием биспецифического антитела.

[0204] Кроме того, описаны различные способы получения и выделения

биспецифических фрагментов антител непосредственно из культуры рекомбинантных клеток. Например, биспецифические антитела продуцируют с использованием «лейциновых молний». Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Пептиды-«лейциновые молнии» из белков Fos и Jun связывали с Fab' -фрагментами двух различных антител посредством объединения генов. Гомодимеры антител восстанавливали по шарнирной области с образованием мономеров и затем повторно окисляли с образованием гетеродимеров антител. Этот способ также можно применять для получения гомодимеров антител. Технология «диател», описанная Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993), представляет собой альтернативный механизм получения биспецифических фрагментов антител. Эти фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи (V_H), соединенный с переменным доменом легкой цепи (V_L) линкером, который является слишком коротким для образования пары из двух доменов на одной и той же цепи. Соответственно, V_H - и V_L -домены одного фрагмента вынуждены образовывать пару с комплементарными V_L - и V_H -доменами другого фрагмента, тем самым образуя два антигенсвязывающих сайта. Кроме того, сообщалось о еще одной стратегии получения биспецифических фрагментов антитела с использованием димеров одноцепочечных Fv (scFv)-фрагментов. См. Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

[0205] Еще одна методика получения биспецифических фрагментов антител представляет собой «биспецифический активатор Т-клеток» или подход BiTE® (см., например, WO2004/106381, WO2005/061547, WO2007/042261 и WO2008/119567). Этот подход использует два переменных домена антитела, упорядоченные в составе одиночного полипептида. Например, одиночная полипептидная цепь содержит два одноцепочечных Fv (scFv)-фрагмента, каждый из которых содержит переменный домен тяжелой цепи (V_H) и переменный домен легкой цепи (V_L), разделенные полипептидным линкером достаточной длины для внутримолекулярной ассоциации между этими двумя доменами. Этот одиночный полипептид дополнительно содержит полипептидную спейсерную последовательность между двумя scFv-фрагментами. Каждый scFv распознает свой эпитоп, и эти эпитопы могут быть специфичны по отношению к клеткам различных типов, так что клетки двух различных типов непосредственно сближаются друг с другом или связываются при присоединении каждого scFv к характерному для него эпитопу. Один конкретный вариант реализации этого подхода включает scFv, распознающий антиген клеточной поверхности, экспрессируемый иммунной клеткой, например, CD3-полипептид Т-клетки, связанный с еще одним scFv, распознающим антиген клеточной поверхности, экспрессируемый клеткой-мишенью, например, злокачественной или опухолевой клеткой.

[0206] Поскольку биспецифический активатор Т-клеток является одиночным полипептидом, его можно экспрессировать с использованием любой системы экспрессии на основе прокариотической клетки, известной в данной области техники. Однако для отделения мономерных биспецифических активаторов Т-клеток от других мультимерных разновидностей, которые могут обладать другими видами биологической деятельности, помимо предполагаемой активности мономера, могут потребоваться специфические способы очистки (см., например, EP1691833). В одной типичной схеме очистки раствор,

содержащий секретлируемые полипептиды, вначале подвергают металл-аффинной хроматографии, а полипептиды элюируют градиентом концентраций имидазола. Этот элюат дополнительно очищают анионообменной хроматографией, полипептиды элюируют градиентом концентраций хлорида натрия. Наконец, этот элюат подвергают
 5 эксклюзионной хроматографии с целью отделения мономеров от мультимерных разновидностей.

[0207] В настоящем изобретении рассматриваются более чем двухвалентные антитела. Например, можно получить триспецифические антитела. *Tuft et al. J. Immunol.* 147: 60 (1991).

10 [0208] В некоторых вариантах реализации двуцепочечный белок является частью полиспецифического антитела или биспецифического антитела. Полиспецифическое антитело или биспецифическое антитело может содержать два или более одновалентных антитела согласно настоящему изобретению.

[0209] В некоторых вариантах реализации первый антигенсвязывающий домен
 15 биспецифического антитела содержит один или более константный домен тяжелой цепи, причем один или более из константных доменов тяжелой цепи выбраны из первого СН1-домена (СН1₁), первый СН2-домен (СН2₁), первый СН3-домен (СН3₁); и второй антигенсвязывающий домен биспецифического антитела содержит один или более
 20 константный домен тяжелой цепи, причем один или более из константных доменов тяжелой цепи выбраны из второго СН1-домена (СН1₂), второго СН2-домена (СН2₂) и второго СН3-домена (СН3₂). В некоторых вариантах реализации по меньшей мере один из одного или более константных доменов тяжелой цепи первого антигенсвязывающего
 25 домена образует пару с другим константным доменом тяжелой цепи второго антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах реализации каждый из СН3₁- и СН3₂-доменов содержит выпуклость или полость, причем выпуклость или полость СН3₁-домена можно расположить в полости или выпуклости, соответственно, СН3₂-домена. В некоторых вариантах реализации СН3₁- и СН3₂-домены находятся в
 30 области интерфейса между указанными выпуклостью и полостью. Типичные наборы аминокислотных замен в СН3₁- и СН3₂-доменах приведены в таблице 2 настоящего документа. В некоторых вариантах реализации каждый из СН2₁- и СН2₂-доменов
 35 содержит выпуклость или полость, причем выпуклость или полость СН2₁-домена можно расположить в полости или выпуклости, соответственно, СН2₂-домена. В некоторых вариантах реализации СН2₁- и СН2₂-домены находятся в области интерфейса между указанными выпуклостью и полостью. В некоторых вариантах реализации СН3₁- и/или СН3₂-домен IgG содержит одну или несколько аминокислотных замен в остатках,
 40 выбранных из группы, состоящей из 347, 349, 350, 351, 366, 368, 370, 392, 394, 395, 398, 399, 405, 407 и 409 согласно нумерации аминокислот, как показано на фиг. 5 патента США № 8216805. В некоторых вариантах реализации выпуклость содержит один или более из внедренных остатков, выбранных из группы, состоящей из остатка аргинина (R), остатка фенилаланина (F), остатка тирозина (Y) и остатка триптофана (W). В некоторых вариантах реализации полость содержит один или более из внедренных
 45 остатков, выбранных из группы, состоящей из остатка аланина (A), остатка серина (S), остатка треонина (T) и остатка валина (V). В некоторых вариантах реализации СН3- или СН2-домены антитела согласно настоящему изобретению получены из IgG (например, подтипа IgG1, подтипа IgG2, подтипа IgG2a, подтипа IgG2b, подтипа IgG3

или подтипа IgG4). В некоторых вариантах реализации один СНЗ-домен биспецифического антитела содержит аминокислотную замену Т366Y, а другой СНЗ-домен содержит аминокислотную замену Y407T. В некоторых вариантах реализации один СНЗ-домен содержит аминокислотную замену Т366W, а другой СНЗ-домен содержит аминокислотную замену Y407A. В некоторых вариантах реализации один СНЗ-домен содержит аминокислотную замену F405A, а другой СНЗ-домен содержит аминокислотную замену Т394W. В некоторых вариантах реализации один СНЗ-домен содержит аминокислотные замены Т366Y и F405A, а другой СНЗ-домен содержит аминокислотные замены Т394W и Y407T. В некоторых вариантах реализации один СНЗ-домен содержит аминокислотные замены Т366W и F405W, а другой СНЗ-домен содержит аминокислотные замены Т394S и Y407A. В некоторых вариантах реализации один СНЗ-домен содержит аминокислотные замены F405W и Y407A, а другой СНЗ-домен содержит аминокислотные замены Т366W и Т394S. В некоторых вариантах реализации один СНЗ-домен содержит аминокислотную замену F405W, а другой СНЗ-домен содержит аминокислотную замену Т394S. Мутации обозначают по исходному остатку, затем указывают положения согласно системе нумерации Кабата, а затем импортируемые остатки. См. также нумерацию на фиг. 5 патента США № 8216805.

(vii) Однодоменные антитела

[0210] В некоторых вариантах реализации антитело согласно настоящему изобретению представляет собой однодоменное антитело. Однодоменное антитело представляет собой одиночную полипептидную цепь, полностью или частично содержащую вариабельный домен тяжелой цепи или полностью, или частично содержащую вариабельный домен легкой цепи антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения однодоменное антитело представляет собой однодоменное антитело человека (Domantis, Inc., Уолтем, штат Массачусетс; см., например, патент США № 6248516 В1). В одном варианте реализации однодоменное антитело полностью или частично состоит из вариабельного домена тяжелой цепи антитела.

(viii) Варианты антител

[0211] В некоторых вариантах реализации рассматривают модификацию(и) аминокислотных последовательностей антител, описанных в настоящем документе. Например, может быть желательным улучшение аффинности и/или других биологических свойств антитела. Варианты аминокислотных последовательностей антитела можно получить путем внесения соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции и/или инсерции и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Для получения конечного конструкта можно внести любую комбинацию делеций, инсерций и замен при условии, что конечный конструкт обладает желательными характеристиками. В аминокислотную последовательность исследуемого антитела можно ввести изменения аминокислот во время получения последовательности.

(ix) Варианты замен, инсерций и делеций

[0212] В некоторых вариантах реализации предлагаются варианты антител, содержащие одну или более аминокислотные замены. Сайты, представляющие интерес для заместительного мутагенеза, включают HVR и FR. Консервативные замены показаны в Таблице 1 под заголовком «консервативные замены». Более существенные изменения приведены в таблице 1 под заголовком «типичные замены» и подробнее описаны ниже по отношению к классам боковой цепи аминокислот. В исследуемое антитело можно внедрить аминокислотные замены и исследовать продукты посредством скрининга на

предмет желательной активности, например, сохранения/улучшения связывания антигена, снижения иммуногенности или улучшения ADCC или CDC.

Таблица 3. Типичные замены

	Исходный остаток	Типичные замены	Предпочтительные замены
5	Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
	Arg (R)	Lys; Gln; Asn	
	Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
	Asp (D)	Glu; Asn	Glu
	Cys (C)	Ser; Ala	Ser
10	Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
	Glu (E)	Asp; Gln	Asp
	Gly (G)		
	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
15	Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
	Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
	Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
	Pro (P)		
	Ser (S)	Thr	Thr
	Thr (T)	Val; Ser	Ser
20	Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
	Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
	Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

[0213] Аминокислоты можно сгруппировать по общим свойствам боковой цепи:

a. гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

b. нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

c. кислые: Asp, Glu;

d. основные: His, Lys, Arg;

e. остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro;

f. ароматические: Trp, Tyr, Phe.

[0214] Неконсервативные замены приводят к замене представителя одного из этих классов на представителя другого класса.

[0215] Один тип вариантов, полученных путем замены, включает замену одного или более остатков гипервариабельной области исходного антитела (например, гуманизированного антитела или антитела человека). Как правило, полученный(е) вариант(ы), отобранные для дальнейшего исследования, характеризуются модификациями (например, улучшением) определенных биологических свойств (например, повышенным сродством, сниженной иммуногенностью) по сравнению с исходным антителом и/или в значительной степени сохраняют определенные биологические свойства исходного антитела. Типичный вариант, получаемый путем замены, представляет собой антитело с созревшим сродством, которое легко получить, например, с использованием методик созревания сродства на основе фагового дисплея, например, описанных в настоящем документе. Вкратце, один или более остатков HVR мутируют и варианты антитела подвергают фаговому дисплею и скринингу на предмет конкретной биологической активности (например, аффинности связывания).

[0216] Модификации (например, замены) можно внести в HVR, например, для улучшения сродства антитела. Такие модификации можно внести в «горячие точки» HVR, т.е. остатки, кодируемые кодонами, с высокой частотой подвергающимися мутациям во время соматического созревания (см., например, Chowdhury, *Methods Mol.*

Biol. 207:179-196 (2008)), и/или SDR (a-CDR), с тестированием сродства связывания полученного варианта VH или VL. Созревание сродства путем конструирования и повторного отбора из вторичных библиотек описано, например, в Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178: 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)).

5 В некоторых вариантах реализации созревания сродства вносят разнообразие в переменные гены, выбранные для созревания, любым из различных способов (например, ПЦР пониженной точности, перетасовки цепей или олигонуклеотид-направленного мутагенеза). Затем создают вторичную библиотеку. Затем библиотеку подвергают скринингу с целью идентификации любых вариантов антител, обладающих
10 желательной аффинностью. Еще один способ внесения разнообразия включает HVR-направленные подходы, в которых рандомизируют несколько остатков HVR (например, 4-6 остатков одновременно). Остатки HVR, участвующие в связывании антигена, можно специфически определить, например, с помощью мутагенеза с аланиновым сканированием или моделирования. В частности, мишенями часто являются CDR-H3
15 и CDR-L3.

[0217] В некоторых вариантах реализации изобретения замены, вставки или делеции могут возникать в одной или более HVR при условии, что такие модификации по существу не снижают способность антитела к связыванию антигена. Например, в HVR можно ввести консервативные модификации (например, консервативные замены, как
20 предложено в настоящем документе), которые по существу не снижают сродство. Такие модификации могут располагаться за пределами "горячих точек" HVR или SDR. В некоторых вариантах реализации вариантов VH- и VL-последовательностей, предлагаемых выше, каждая HVR является немодифицированной или содержит не более одной, двух или трех аминокислотных замен.

[0218] Подходящий способ для идентификации остатков или областей антитела, которые могут являться мишенями для мутагенеза, называется «аланин-сканирующим мутагенезом», как описано в статье Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244: 1081-1085. В данном способе выявляют остаток или группу остатков-мишеней (например, заряженные остатки, например, arg, asp, his, lys и glu) и заменяют его нейтральной или
30 отрицательно заряженной аминокислотой (например, аланином или полиаланином) с целью определения влияния на взаимодействие антитела с антигеном. В аминокислотные положения, демонстрирующие функциональную чувствительность к первоначальной замене, можно ввести дальнейшие замены. В альтернативном или дополнительном варианте формируют кристаллическую структуру антиген-антитело для идентификации
35 точек контакта между антителом и антигеном. Такие контактные остатки и соседние остатки могут быть нацелены или исключены в качестве кандидатов для замен. Варианты можно подвергать скринингу с целью определения наличия у них желательных свойств.

[0219] Вставки в аминокислотную последовательность включают N- и/или C-концевые гибриды длиной от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более
40 остатков, а также вставки одного или множества аминокислотных остатков внутри последовательности. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым остатком метионина. Другие инсерционные варианты молекулы антитела включают присоединение к N- или C-концу антитела фермента (например, для ADEPT) или
45 полипептида, что увеличивает период полувыведения антитела из сыворотки.

(х) Варианты Fc-фрагмента

[0220] В некоторых вариантах реализации изобретения в Fc-область антитела, предлагаемого в настоящем документе, можно ввести одну или более аминокислотных

модификаций, тем самым получая вариант Fc-области. Вариант Fc-области может содержать последовательность Fc-области человека (например, Fc-области IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека), содержащую аминокислотную модификацию (например, замену) в одном или более аминокислотных положениях.

5 [0221] В некоторых вариантах реализации рассматривается вариант антитела, обладающий некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, что делает его желательным кандидатом для вариантов применения, при которых важен период полужизни антитела *in vivo*, а некоторые эффекторные функции (например, комплемент и ADCC) не нужны или вредны. Для подтверждения снижения/ослабления CDC- и/или
10 ADCC-активности можно выполнить анализ цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo*. Например, чтобы убедиться в отсутствии связывания антитела с FcγR (и, следовательно, отсутствии ADCC-активности) при сохранении способности связывания с FcRn можно выполнить анализ связывания Fc-рецептора (FcR). Основные опосредующие ADCC клетки - NK-клетки - экспрессируют только Fc(RII, в то время как моноциты
15 экспрессируют Fc(RI, Fc(RII и Fc(RIII). Сводная информация об экспрессии FcR на кроветворных клетках приведена в Таблице 3 на странице 464 статьи Ravetch and Kinet, *Annu Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991)). Неограничивающие примеры анализа *in vitro* для оценки ADCC-активности исследуемой молекулы описаны в патенте США №5500362 (см, например, Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83: 7059-7063 (1986)) и Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5821337 (см, Bruggemann, M. et al.,
20 *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). В качестве альтернативы можно использовать виды анализа, не связанные с использованием радиоактивных веществ (см., например, анализ цитотоксичности АСТП™ для проточной цитометрии без использования радиоактивных веществ (CellTechnology, Inc., Маунтин-Вью, штат Калифорния, США; и анализ
25 цитотоксичности CytoTox 96® без использования радиоактивных веществ (Promega, Мэдисон, штат Висконсин). Эффекторные клетки, пригодные для такого анализа, включают мононуклеары периферической крови (МКПК) и естественные киллеры (NK). В качестве альтернативы или дополнения, ADCC-активность молекулы, представляющей интерес, можно оценить *in vivo*, например, на животной модели,
30 например, согласно описанию в публикации Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95: 652-656 (1998). Кроме того, можно выполнить анализ связывания C1q с целью подтверждения неспособности антитела связывать C1q и, следовательно, отсутствия КЗЦ-активности. См., например, твердофазный ИФА связывания C1q и C3c в WO 2006/029879 и WO 2005/100402. Для оценки активации комплемента можно выполнить анализ
35 CDC (см., например, Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., *Blood* 101:1045-1052 (2003); и Cragg, M.S. and M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). Кроме того, можно определить связывание и выведение/период полужизни FcRn *in vivo* с использованием способов, известных в данной области техники (см., например, Petkova, S. B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

40 [0222] Антитела с пониженной эффекторной функцией включают антитела с заменой одного или более остатков 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 Fc-области (патент США № 6737056). Такие Fc-мутанты включают Fc-мутантов с заменами в двух или более аминокислотных положениях 265, 269, 270, 297 и 327, включая так называемые Fc-мутанты "DANA" с заменой остатков 265 и 297 на аланин (патент США № 7332581).

45 [0223] Описаны некоторые варианты антител с улучшенным или уменьшенным связыванием с FcR. (См., например, патент США №6737056; WO 2004/056312 и Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).)

[0224] В некоторых вариантах реализации вариант антитела содержит Fc-область с

одной или более аминокислотными заменами, улучшающими ADCC, например, заменами в положениях 298, 333 и 334 Fc-области (ЕС-нумерация остатков). В типичном варианте реализации антитело содержит следующие аминокислотные замены в Fc-области: S298A, E333A и K334A.

5 [0225] В некоторых вариантах реализации вносят изменения в Fc-область, что приводит к изменению (т.е. улучшению или снижению) связывания C1q и/или комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), например, как описано в патенте США №6194551, WO 99/51642 и Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

10 [0226] Антитела с увеличенным периодом полужизни и улучшенным связыванием с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), который отвечает за передачу IgG матери плоду (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) и Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), описаны в US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Указанные антитела содержат Fc-область с одной или более заменами, которые улучшают связывание Fc-области с FcRn. Такие варианты Fc включают варианты с заменами одного или более остатков Fc-области: 238, 256, 265, 15 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434, например, заменой остатка 434 Fc-области (патент США № 7371826). Другие примеры вариантов Fc-области см. также в Duncan & Winter, *Nature* 322: 738-40 (1988); патенте США №5648260; патенте США №5624821 и WO 94/29351.

(xi) Производные антител

20 [0227] Антитела согласно настоящему изобретению можно дополнительно модифицировать, внедряя в них дополнительные небелковые фрагменты, легкодоступные и известные в данной области техники. В некоторых вариантах реализации фрагменты, подходящие для получения производных антитела, включают водорастворимые полимеры. Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров 25 включают полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (гомополимеры или случайные сополимеры) и декстран или поли (п-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимеры 30 пропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси, но не ограничиваются ими. Пропионовый альдегид полиэтиленгликоля может обладать преимуществами при производстве из-за его стабильности в воде. Указанный полимер может обладать любой молекулярной массой и быть разветвленным или неразветвленным. Количество молекул полимера, 35 присоединенных к антителу, может меняться, и при присоединении более чем одного полимера они могут представлять собой одинаковые или разные молекулы. В целом, количество и/или тип полимеров, применяемых для получения производных, можно определить с учетом факторов, включающих конкретные свойства или функции антител, подлежащие улучшению, возможность применения производных антитела в терапии 40 при определенных условиях и т.д., но не ограничивающихся этим.

(xii) Векторы, клетки-хозяева и рекомбинантные методики

[0228] Антитела можно получать с помощью рекомбинантных способов. Для рекомбинантного получения антитела против антигена нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, выделяют и внедряют в реплицируемый вектор для дальнейшего 45 клонирования (амплификации ДНК) или экспрессии. ДНК, кодирующую антитело легко выделить и секвенировать с помощью стандартных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, способных специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела). Доступно большое количество

векторов. Компоненты вектора обычно включают один или более из следующих элементов: сигнальную последовательность, сайт инициации репликации, один или более маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и терминатор транскрипции, но не ограничиваются ими.

5 (a) Компонент сигнальной последовательности

[0229] Антитело согласно настоящему изобретению можно рекомбинантно получить не только напрямую, но и в качестве гибридного полипептида с гетерологичным полипептидом, который предпочтительно представляет собой сигнальную последовательность или другой полипептид, содержащий специфический сайт расщепления на N-конце зрелого белка или полипептида. Предпочтительно выбираемой гетерологичной сигнальной последовательностью является последовательность, распознаваемая и подвергаемая процессингу (например, отщепляемая сигнальной пептидазой) в клетке-хозяине. Для прокариотических клеток, не распознающих и не подвергающих процессингу нативную сигнальную последовательность антитела, 15 сигнальную последовательность замещают сигнальной последовательностью прокариот, выбранной, например, из группы лидеров щелочной фосфатазы, пенициллиназы, Ipp или термостабильного энтеротоксина II.

(b) Сайт инициации репликации

[0230] Векторы для экспрессии и клонирования содержат последовательность нуклеиновой кислоты, обеспечивающую репликацию вектора в одной или более 20 выбранных клетках-хозяевах. Как правило, при клонировании векторов эта последовательность позволяет вектору реплицироваться независимо от хромосомной ДНК хозяина и включает сайты инициации репликации или автономно реплицирующиеся последовательности. Такие последовательности хорошо известны для различных 25 прокариотических клеток-хозяев. Например, сайт инициации репликации плазмиды pBR322 подходит для большинства грамотрицательных бактерий.

(c) Компонент селективного гена

[0231] Экспрессирующие и клонирующие векторы обычно содержат селективный ген, также называемый селективным маркером. Типичные гены селективных маркеров 30 кодируют белки, которые (a) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, тетрациклину или канамицину; (b) восполняют ауксотрофную недостаточность или (c) поставляют критически важные питательные вещества, недоступные в сложных средах, например, ген, кодирующий рацемазу D-аланина бацилл.

35 [0232] В одном из примеров схемы селекции используется лекарственное вещество, останавливающее рост клетки-хозяина. Клетки, успешно трансформированные гетерологичным геном, продуцируют белок, придающий устойчивость к лекарственному веществу, и, таким образом, выживают при данной схеме селекции. В примерах такой доминантной селекции используются лекарственные вещества неомицин, микофеноловая 40 кислота и гигромицин.

[0233] В еще одной схеме селекции используется прокариотическая клетка-хозяин с хромосомной делецией гена, продукт которого имеет важное значение для роста в конкретной культуральной среде. В этих примерах клетки, успешно трансформированные гетерологичным геном, восполняющим хромосомную делецию 45 клетки-хозяина, выживают при росте в данной конкретной культуральной среде. Примеры генов, которые можно применять в указанной схеме, могут включать ауксотрофные маркерные гены или другие гены, необходимые для получения необходимых питательных веществ при росте клетки-хозяина в конкретной

культуральной среде.

(d) Промоторный компонент

[0234] Экспрессирующие и клонирующие векторы обычно содержат промотор, распознаваемый организмом-хозяином и функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей антитело. Промоторы, подходящие для применения с хозяевами-прокариотами, включают промотор *phoA*, промоторные системы β -лактамазы и лактозы, промотор щелочной фосфатазы, промоторную систему триптофана (*trp*) и гибридные промоторы, например, *tac*-промотор. В то же время, можно использовать другие известные бактериальные промоторы. Промоторы для применения в бактериальных системах, также содержат последовательность Шайна-Дальгарно (S.D.), функционально связанную с ДНК, кодирующей антитело.

(e) Компонент области инициации трансляции

[0235] Известно, что области инициации трансляции (TIR) имеют важное значение для трансляции рекомбинантных белков в прокариотических клетках-хозяевах (см., например, Simmons LC and Yansura DG 1996 Nat. Biotechnol. 14:629 and Vimberg V et al. 2007 BMC Mol. Biol. 8:100). TIR может определять эффективность трансляции единицы трансляции. TIR обычно содержит функционал единицы трансляции, например, кодон инициации, последовательность Шайна-Дальгарно (SD) и энхансеры трансляции. TIR может дополнительно содержать сигнальную последовательность секреции, кодирующую сигнальный пептид. Последовательность и расстояние между функциональными блоками TIR может регулировать эффективность инициации трансляции. Дополнительное описание применения TIR при продукции белка см., например, патент США № 5840523 (Simmons et al.), в котором описана область инициации трансляции (TIR) и сигнальные последовательности для оптимизации экспрессии и секреции.

(f) Компонент терминатора транскрипции

[0236] Экспрессирующие векторы, используемые в прокариотических клетках-хозяевах, также могут содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и стабилизации мРНК. В прокариотических клетках терминаторы могут содержать Rho-зависимые или Rho-независимые терминаторы. Одним из примеров терминатора, который можно использовать в прокариотических клетках-хозяевах, включает, без ограничения, λ 0-терминатор (Scholtissek and Grosse, Nucleic Acids Res. 15: 3185, 1987).

III. Оптимизация процесса

[0237] В настоящем документе предложены способы получения полипептида, содержащего две цепи, в прокариотической клетке-хозяине путем культивирования клетки-хозяина с целью экспрессии двух цепей полипептида, причем после экспрессии две цепи подвергаются фолдингу и сборке с образованием биологически активного полипептида в клетке-хозяине, причем клетку-хозяина культивируют в культуральной среде в условиях, предусматривающих: температуру при фазе роста и скорость перемешивания при фазе роста, и стадию образования продукта, характеризующуюся температурой при фазе образования продукта и скоростью перемешивания при фазе образования продукта, причем температура при фазе роста на 2-10° превышает температуру при фазе образования продукта, и скорость перемешивания при фазе роста на 50-250 об/мин превышает скорость перемешивания при фазе образования продукта. В ходе совершения настоящего изобретения сделано неожиданное открытие, что некоторые варианты оптимизации процесса получения обеспечивают резкое увеличение выхода двуцепочечных белков, как свидетельствуют данные, описанные в настоящем

документе.

(g) Селекция и трансформация клеток-хозяев

[0238] Некоторые аспекты настоящего изобретения касаются прокариотических клеток-хозяев. Прокариоты, подходящие для клонирования или экспрессии ДНК в векторах, описанных в настоящем документе, включают эубактерий, например, грамотрицательные и грамположительные организмы, например, *Enterobacteriaceae*, например, *Escherichia*, например, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, например, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, например, *Serratia marcescans*, и *Shigella*, а также бацилл, например, *B. subtilis* и *B. licheniformis* (например, *B. licheniformis* 41P, описанную в DD 266.710, опубликованной 12 апреля. 1989), *Pseudomonas*, такой как *P. aeruginosa*, и *Streptomyces*. Одним из предпочтительных хозяев для клонирования на основе *E. coli* является *E. coli* 294 (ATCC 31446), хотя можно применять и другие штаммы, например, *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31537) и *E. coli* W3110 (ATCC 27325). Эти примеры являются иллюстративными, а не ограничивающими.

[0239] В некоторых вариантах реализации прокариотическая клетка-хозяин является грамотрицательной бактерией. Термин «грамотрицательная бактерия» относится к любой бактерии, содержащий внешнюю мембрану, окружающую пептидогликановый слой, обнаруживаемый при окрашивании по Граму. В данной области техники известно большое количество грамотрицательных бактериальных клеток-хозяев. Например, известно, что грамотрицательные бактерии включают, без ограничения, протеобактерий, например, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Zetaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* и *Acidobacteria*, цианобактерий и спирохет. Хорошо известные грамотрицательные бактерии могут включать виды из родов *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Heliobacter*, *Legionella*, *Neisseria* и *Klebsiella*.

[0240] В некоторых вариантах реализации грамотрицательная бактерия согласно настоящему изобретению представляет собой *E. coli*. В настоящем документе *E. coli* может относиться к любому штамму или изоляту бактерии, принадлежащему к виду *E. coli*. *E. coli* может включать естественные штаммы или генетически модифицированные штаммы, например, в результате мутации или трансформации плазмидой, как описано в настоящем документе.

[0241] В некоторых вариантах реализации *E. coli* согласно настоящему изобретению представляет собой штамм, дефектный по эндогенной протеазной активности. Безотносительно к теоретическим представлениям считается, что штаммы, дефектные по эндогенной протеазной активности, могут обеспечить усиленную продукцию рекомбинантных белков, например, периплазматических белков согласно настоящему изобретению, поскольку некоторые эндогенные протеазы обладают активностью против рекомбинантно экспрессируемых субстратов (один из таких примеров см. в Baneyx F and Georgiu G, 1990 J. Bacteriol. 172(1):491). Штаммы, дефектные по эндогенной протеазной активности, могут включать штаммы, в которых ген, кодирующий эндогенную протеазу, мутирован, deletирован или инактивирован иным образом. Примеры таких генов могут включать, без ограничения, *degP*, *prc* и *ompT*. В данной области техники хорошо известны способы внедрения мутаций в разнообразные прокариотические клетки-хозяева (например, для конструирования штаммов, дефектных по эндогенной протеазной активности); см., например, Snyder L et al. 2013 Molecular Genetics of Bacteria 4th ed. ASM Press).

[0242] Двухцепочечные белки, например, полноразмерное антитело, фрагменты антител и гибридные белки, содержащие антитела, можно продуцировать в бактериях, в частности, при отсутствии необходимости гликозилирования и сохранения эффекторных

функций Fc, например, если конъюгировании терапевтического антитела с цитотоксическим агентом (например, токсином), который сам по себе эффективно разрушает опухолевые клетки. Полноразмерные антитела обладают более длительным периодом полужизни в циркуляторном русле. Получение в *E. coli* является более

5 быстрым и экономически выгодным способом. Информацию об экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях см., например, в патенте США № 5648237 (Carter et. al.), патенте США № 5789199 (Joly et al.), патенте США № 5840523 (Simmons et al.), в котором описана область инициации трансляции (TIR) и сигнальные последовательности для оптимизации экспрессии и секреции. См. также Charlton, *Methods in Molecular Biology*,

10 Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N. J., 2003), pp. 245-254, где описана экспрессия фрагментов антитела в *E. coli*. После экспрессии антитело можно выделить из клеточной массы *E. coli* в растворимую фракцию; его можно очистить, например, с помощью колонки с белком А или G в зависимости от его изоформа. Конечную очистку можно выполнить аналогично способу очистки антитела, экспрессируемого, например,

15 в клетках СНО.

[0243] Клетки-хозяева трансформируют вышеописанными векторами для экспрессии или клонирования с целью получения двуцепочечного белка и культивируют в традиционных питательных средах, модифицированных по необходимости для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих требуемые

20 последовательности.

(h) Культивирование клеток-хозяев

[0244] Некоторые аспекты настоящего изобретения касаются культивирования клетки-хозяина в культуральной среде в условиях, включающих ростовую фазу и продуктивную фазу. Каждая из этих фаз может иметь отношение к условиям, при которых происходит

25 рост клетки-хозяина в течение конкретной фазы. Например, в настоящем документе фаза роста может характеризоваться температурой при фазе роста и скоростью перемешивания при фазе роста, и фаза образования продукта может характеризоваться температурой при фазе образования продукта и скоростью перемешивания при фазе образования продукта.

[0245] Фаза роста (ростовая фаза) может относиться к любому времени, в течение которого происходит экспоненциальный рост культуры клетки-хозяина. Температура при фазе роста в настоящем документе может относиться к температуре культуральной среды, содержащей клетку-хозяина согласно настоящему изобретению, во время фазы

30 роста клетки-хозяина. Фазу роста культуры клетки-хозяина можно определить способами, широко известными в данной области техники, например, путем измерения оптической плотности культуры (например, при длине волны 550 нм, около 600 нм или при длине волны между этими значениями) в зависимости от времени и определения момента прекращения экспоненциальной фазы роста. Если клетка-хозяин содержит вектор с rho-промотором, фаза роста может относиться к любому времени, в течение

40 которого происходит экспоненциальный рост культуры клетки-хозяина, и концентрация фосфатов в культуральной среде является достаточной для предотвращения индукции транскрипции гена, опосредованной rho-промотором.

[0246] Фаза образования продукта (фаза продукции, фаза продуцирования) может относиться к любому времени, в течение которого культура клетки-хозяина продуцирует

45 продукт. Температура при фазе образования продукта в настоящем документе может относиться к температуре культуральной среды, содержащей клетку-хозяина согласно настоящему изобретению, во время фазы образования продукта клеткой-хозяином. Если клетка-хозяин содержит вектор с rho-промотором, запускающим экспрессию

продукта, фаза образования продукта может относиться к любому времени, в течение которого концентрация фосфатов в культуральной среде является достаточно низкой для индукции транскрипции гена продукта, опосредованной rho-промотором.

[0247] В некоторых вариантах реализации клетку-хозяина согласно настоящему изобретению культивируют при температуре при фазе роста, на 2-10°C превышающей температуру при фазе образования продукта. В некоторых вариантах реализации клетку-хозяина согласно настоящему изобретению культивируют при температуре при фазе роста, на 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C или 10°C превышающей температуру при фазе образования продукта. В некоторых вариантах реализации температура при фазе роста превышает температуру при фазе образования продукта менее чем на около любую из следующих величин (в °C): 10, 9,5, 9, 8,5, 8, 7,5, 7, 6,5, 6, 5,5, 5, 4,5, 4, 3,5, 3 или 2,5. В некоторых вариантах реализации температура при фазе роста превышает температуру при фазе образования продукта более чем на около любую из следующих величин (в °C): 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9 или 9,5. Т.е. температура при фазе роста превышает температуру при фазе образования продукта на любую из ряда величин (в °C) с верхним пределом, составляющим 10, 9,5, 9, 8,5, 8, 7,5, 7, 6,5, 6, 5,5, 5, 4,5, 4, 3,5, 3 или 2,5, и независимо выбранным нижним пределом, составляющим 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9 или 9,5, причем нижний предел меньше верхнего предела.

[0248] В некоторых вариантах реализации температура при фазе роста во время фазы роста находится в диапазоне от около 30°C до около 34°C. В некоторых вариантах реализации температура при фазе роста во время фазы роста составляет около 30°C, около 30,5°C, около 31°C, около 31,5°C, около 32°C, около 32,5°C, около 33 °C, около 33,5 °C или около 34°C. В некоторых вариантах реализации температура при фазе роста во время фазы роста меньше около любого из следующих значений температуры (в °C): 34, 33,5, 33, 32,5, 32, 31,5, 31 или 30,5. В некоторых вариантах реализации температура при фазе роста во время фазы роста больше около любого из следующих значений температуры (в °C): 30, 30,5, 31, 31,5, 32, 32,5, 33 или 33,5. Т.е. температура при фазе роста во время фазы роста может находиться в любом диапазоне температур (в °C) с верхним пределом, составляющим 34, 33,5, 33, 32,5, 32, 31,5, 31 или 30,5, и независимо выбранным нижним пределом, составляющим 30, 30,5, 31, 31,5, 32, 32,5, 33 или 33,5, причем нижний предел меньше верхнего предела.

[0249] В некоторых вариантах реализации температура при фазе образования продукта во время фазы образования продукта находится в диапазоне от около 25°C до около 29°C. В некоторых вариантах реализации температура при фазе образования продукта во время фазы образования продукта составляет около 25°C, около 25,5°C, около 26°C, около 26,5°C, около 27°C, около 27,5°C, около 28°C, около 28,5°C или около 29°C. В некоторых вариантах реализации температура при фазе образования продукта во время фазы образования продукта меньше около любого из следующих значений температуры (в °C): 29, 28,5, 28, 27,5, 27, 26,5, 26 или 25,5. В некоторых вариантах реализации температура при фазе образования продукта во время фазы образования продукта больше около любого из следующих значений температуры (в °C): 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28 или 28,5. Т.е. температура при фазе образования продукта во время фазы образования продукта может находиться в любом диапазоне температур (в °C) с верхним пределом, составляющим 29, 28,5, 28, 27,5, 27, 26,5, 26 или 25,5, и независимо выбранным нижним пределом, составляющим 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28 или 28,5, причем нижний предел меньше верхнего предела.

[0250] Скорость перемешивания относится к скорости, с которой перемешивают

культуру клеток (например, путем встряхивания). Скорость перемешивания при росте в настоящем документе может относиться к скорости, с которой перемешивают культуру, содержащую клетку-хозяина согласно настоящему изобретению, во время фазы роста клетки-хозяина. Скорость перемешивания при фазе образования продукта в настоящем документе может относиться к скорости, с которой перемешивают культуру, содержащую клетку-хозяина согласно настоящему изобретению, во время фазы образования продукта клетки-хозяина. Культуры клеток можно перемешивать для поддержания аэрации культуры клеток.

[0251] В некоторых вариантах реализации клетку-хозяина согласно настоящему изобретению культивируют при скорости перемешивания при росте, на 50-250 об/мин превышающей скорость перемешивания при фазе образования продукта. В некоторых вариантах реализации клетку-хозяина согласно настоящему изобретению культивируют при скорости перемешивания при росте, на 50 об/мин, 75 об/мин, 100 об/мин, 125 об/мин, 150 об/мин, 175 об/мин, 200 об/мин, 225 об/мин или 250 об/мин превышающей скорость перемешивания при фазе образования продукта. В некоторых вариантах реализации скорость перемешивания при росте превышает скорость перемешивания при фазе образования продукта менее чем на около любую из следующих величин (в об/мин): 250, 225, 200, 175, 150, 125, 100 или 75. В некоторых вариантах реализации скорость перемешивания при росте меньше скорости перемешивания при продукции более чем на около любую из следующих величин (в об/мин): 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 или 225. Т.е. скорость перемешивания при росте превышает скорость перемешивания при фазе образования продукта на любую величину из диапазона скоростей (в об/мин) с верхним пределом, составляющим 250, 225, 200, 175, 150, 125, 100 или 75, и независимо выбранным нижним пределом, составляющим 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 или 225, причем нижний предел меньше верхнего предела.

[0252] В некоторых вариантах реализации скорость перемешивания при росте во время фазы роста находится в диапазоне от около 600 до 800 об/мин. В некоторых вариантах реализации скорость перемешивания при росте во время фазы роста составляет около 600 об/мин, около 625 об/мин, около 650 об/мин, около 675 об/мин, около 700 об/мин, около 725 об/мин, около 750 об/мин, около 775 об/мин или около 800 об/мин. В некоторых вариантах реализации скорость перемешивания при росте меньше около любого из следующих скорости (в об/мин): 800, 775, 750, 725, 700, 675, 650 или 625. В некоторых вариантах реализации скорость перемешивания при росте во время фазы роста больше около любого из следующих скорости (в об/мин): 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750 или 775. Т.е. скорость перемешивания при росте во время фазы роста находится в любом из диапазона скоростей (в об/мин) с верхним пределом, составляющим 800, 775, 750, 725, 700, 675, 650 или 625, и независимо выбранным нижним пределом, составляющим 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750 или 775, причем нижний предел меньше верхнего предела.

[0253] В некоторых вариантах реализации скорость перемешивания при фазе образования продукта во время фазы образования продукта находится в диапазоне от около 300 до 500 об/мин. В некоторых вариантах реализации скорость перемешивания при фазе образования продукта во время фазы образования продукта составляет около 300 об/мин, около 325 об/мин, около 350 об/мин, около 375 об/мин, около 400 об/мин, около 425 об/мин, около 450 об/мин, около 475 об/мин или около 500 об/мин. В некоторых вариантах реализации скорость перемешивания при фазе образования продукта во время фазы образования продукта меньше около любого из следующих значений скорости (в об/мин): 500, 475, 450, 425, 400, 375, 350 или 325. В некоторых

вариантах реализации скорость перемешивания при фазе образования продукта во время фазы образования продукта больше около любого из следующих значений скорости (в об/мин): 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450 или 475. Т.е. скорость перемешивания при фазе образования продукта во время фазы образования продукта находится в
 5 любом из диапазона скоростей (в об/мин) с верхним пределом, составляющим 500, 475, 450, 425, 400, 375, 350 или 325, и независимо выбранным нижним пределом, составляющим 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450 или 475, причем нижний предел меньше верхнего предела.

[0254] Безотносительно к теоретическим представлениям считается, что при
 10 ограниченной концентрации кислорода скорость переноса кислорода (OTR) равна скорости поглощения кислорода (OUR) или скорости метаболизма клеток. Манипуляции с OTR можно облегчить, регулируя скорость перемешивания и тем самым манипулируя OUR. Более подробное описание OUR и ее взаимосвязи с OTR можно найти в статье Ochoa-Garcia et al., Biotechnol. Adv. 27:153, 2009. В данной области техники известны
 15 способы измерения OUR в культуре клеток, которые включают, без ограничения, использование масс-спектрометра для мониторинга состава отработанного газа при культивировании клеток и расчет скорости поглощения кислорода и выделения углекислого газа при культивировании клеток.

[0255] В некоторых вариантах реализации клетку-хозяина согласно настоящему
 20 изобретению культивируют при скорости перемешивания при росте, достаточной для достижения скорости поглощения кислорода клеткой-хозяином в фазе роста, на 0,5-2,5 ммоль/л/мин превышающей пиковую скорость поглощения кислорода клеткой-хозяином в фазе образования продукта. В ходе совершения настоящего изобретения сделано открытие, что снижение скорости перемешивания культуры клеток во время фазы
 25 образования продукта до скорости, достаточной для достижения скорости поглощения кислорода клеткой-хозяином, около на 2,5 ммоль/л/мин меньшей по сравнению с фазой роста, значительно усиливает продукцию продукта, например, двуцепочечного полипептида согласно настоящему изобретению.

[0256] В некоторых вариантах реализации клетку-хозяина согласно настоящему
 30 изобретению культивируют при скорости перемешивания при росте, достаточной для достижения скорости поглощения кислорода клеткой-хозяином в фазе роста, на 0,5 ммоль/л/мин, 1,0 ммоль/л/мин, 1,5 ммоль/л/мин, 2,0 ммоль/л/мин или 2,5 ммоль/л/мин превышающей пиковую скорость поглощения кислорода клеткой-хозяином в фазе образования продукта. В некоторых вариантах реализации клетку-хозяина согласно
 35 настоящему изобретению культивируют при скорости перемешивания при росте, достаточной для достижения скорости поглощения кислорода клеткой-хозяином в фазе роста, менее чем на около любое из следующих значений скорости поглощения кислорода (в ммоль/л/мин) превышающей пиковую скорость поглощения кислорода клеткой-хозяином в фазе образования продукта: 2,5, 2,0, 1,5 или 1,0. В некоторых
 40 вариантах реализации клетку-хозяина согласно настоящему изобретению культивируют при скорости перемешивания при росте, достаточной для достижения скорости поглощения кислорода клеткой-хозяином в фазе роста, более чем на около любое из следующих значений скорости поглощения кислорода (в ммоль/л/мин) превышающей пиковую скорость поглощения кислорода клеткой-хозяином в фазе образования
 45 продукта: 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 или 2,5. Т.е. клетку-хозяина согласно настоящему изобретению культивируют при скорости перемешивания при росте, достаточной для достижения скорости поглощения кислорода клеткой-хозяином в фазе роста, превышающей пиковую скорость поглощения кислорода клеткой-хозяином в фазе образования продукта на

величину, находящуюся в любом из диапазонов скорости поглощения кислорода (в ммоль/л/мин) с верхним пределом, составляющим 2,5, 2,0, 1,5 или 1,0, и независимо выбранным нижним пределом, составляющим 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 или 2,5, причем нижний предел менее верхнего предела.

- 5 [0257] В некоторых вариантах реализации пиковая скорость поглощения кислорода клеткой-хозяином во время фазы роста находится в диапазоне от 3,5 ммоль/л/мин до 4,5 ммоль/л/мин. В некоторых вариантах реализации пиковая скорость поглощения кислорода клеткой-хозяином во время фазы роста составляет 3,5 ммоль/л/мин, 3,75 ммоль/л/мин, 4,0 ммоль/л/мин, 4,25 ммоль/л/мин или 4,5 ммоль/л/мин. В некоторых
- 10 вариантах реализации скорость поглощения кислорода клеткой-хозяином во время фазы образования продукта находится в диапазоне от 1,0 ммоль/л/мин до 3,0 ммоль/л/мин. В некоторых вариантах реализации скорость поглощения кислорода клеткой-хозяином во время фазы образования продукта составляет 1,0 ммоль/л/мин, 1,25 ммоль/л/мин, 1,5 ммоль/л/мин, 1,75 ммоль/л/мин, 2,0 ммоль/л/мин, 2,25 ммоль/л/мин, 2,5 ммоль/л/мин, 2,75 ммоль/л/мин или 3,0 ммоль/л/мин.

- [0258] В некоторых вариантах реализации клетку-хозяина согласно настоящему изобретению культивируют при скорости перемешивания при росте, на от около 10% до около 40% (об/мин/об/мин) превышающей скорость перемешивания при фазе образования продукта. В некоторых вариантах реализации клетку-хозяина культивируют
- 20 при скорости перемешивания при фазе роста с нижним пределом, составляющим по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30% или 35% (об/мин/об/мин) и независимо выбранным верхним пределом, составляющим не более 40%, 35%, 30%, 25%, 20% или 15% (об/мин/об/мин) от скорости перемешивания при фазе образования продукта. В предпочтительном варианте реализации клетку-хозяина согласно настоящему
- 25 изобретению культивируют в 10-л ферментере при противодавлении 1 бар и скорости аэрации 20 л/мин.

- [0259] Клетки-хозяева согласно настоящему изобретению можно культивировать в различных средах. «Культуральная среда» в настоящем документе относится к любой композиции или жидкой среде, поддерживающей рост бактерий согласно настоящему
- 30 изобретению. Подходящие культуральные среды могут быть жидкими или твердыми и содержать любые питательные вещества, соли, буферные компоненты, элементы и другие соединения, поддерживающие рост и жизнеспособность клеток. Распространенные питательные вещества в составе культуральной среды могут включать источники азота, углерода, аминокислоты, углеводы, микроэлементы,
- 35 витамины и минеральные вещества. Эти питательные вещества можно добавлять в качестве отдельных компонентов (в культуральной среде известного состава) или в качестве компонентов экстракта сложного состава (например, дрожжевого экстракта). Культуральная среда может быть богатой и поддерживать быстрый рост или минимальной и поддерживать замедленный рост. Культуральная среда может также
- 40 содержать любой агент, используемый для ингибирования роста или уничтожения загрязняющих организмов (например, антибиотик). Культуральная среда может также содержать любое соединение, используемое для контроля активности индуцибельного промотора или фермента (в качестве одного из примеров, можно внести IPTG для индукции экспрессии любых полинуклеотидов под контролем *lac*-оперона или
- 45 функционально аналогичного промотора). В данной области техники хорошо известно большое количество примеров подходящих культуральных сред, которые включают, без ограничения, среду M9, лизогенный бульон (LB), Terrific Broth (TB), NZY-бульон, среду SOB и YT-бульон.

[0260] В любую из этих сред при необходимости можно добавлять соли (например, хлорид натрия, кальций, магний и фосфат), буферы (например, HEPES), нуклеотиды (например, аденозин и тимидин), антибиотики, противогрибковые средства, микроэлементы (определяемые как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях, находящихся в микромолярном диапазоне), глюкозу и/или соответствующий источник энергии. Типичные компоненты, содержащиеся в среде для культивирования прокариотических клеток, включают дрожжевой экстракт, соли (например, NaCl), триптон, буферы (например, фосфатный буфер), глицерин и т.д. Кроме того, в среду можно включать любые другие необходимые добавки в соответствующих концентрациях, известных специалистам в данной области. Такие условия культивирования, как температура, pH и т.п., совпадают с условиями, использованными ранее при культивировании прокариотических клеток-хозяев, выбранных для экспрессии, и очевидны для специалиста в данной области.

(i) Очистка биологически активного полипептида

[0261] Некоторые аспекты настоящего изобретения касаются выделения биологически активного полипептида из клетки-хозяина. Обычно выделение (в настоящем документе можно на равных основаниях использовать термины «очищение» или «очистка») биологически активного полипептида согласно настоящему изобретению включает выделение полипептида из клетки-хозяина (или клеточной культуральной среды, если полипептид выделяется в среду) и очистки полипептида от других связанных с ним макромолекул, например, остатков клеток и других полипептидов. В данной области техники известны многочисленные способы выделения различных белков из различных компартментов клетки-хозяина (см, например, Evans, Jr., TC and Xu MQ (eds.) *Heterologous Gene Expression in E. coli* (2011) *Methods in Molecular Biology* Vol 705, Humana Press).

Типичные методики описаны ниже, однако они включены только для иллюстративных целей с целью лучшего понимания для специалистов и никоим образом не предназначены для ограничения.

[0262] При использовании рекомбинантных методик двуцепочечные белки, например, секретируемые белки, можно продуцировать внутриклеточно, в периплазматическом пространстве или напрямую секретировать в среду. Если секреторный белок продуцируют внутриклеточно, на первом этапе удаляют обломки частиц, клетки-хозяева или лизированные фрагменты, например, путем центрифугирования или ультрафильтрации.

[0263] В некоторых вариантах реализации секреторный белок выделяют из периплазмы клетки-хозяина. Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) описана процедура выделения белков, секретируемых в периплазматическое пространство *E. coli*. Вкратце, массу клеток размораживают в присутствии ацетата натрия (pH 3,5), ЭДТА и фенилметилсульфонилхлорида (PMSF) в течение около 30 мин. Если белок секретируется в среду, супернатант из таких систем экспрессии обычно сначала концентрируют с помощью доступных для приобретения фильтров для концентрирования белка, например, установок ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. Для ингибирования протеолиза на любом из предыдущих этапов можно включать ингибитор протеаз, например, PMSF, а для предотвращения роста случайных контаминантов можно добавлять антибиотики.

[0264] Композицию секретируемого белка, полученную из клеток, можно очистить с помощью, например, хроматографии на гидроксипатите, гидрофобной хроматографии, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии, причем аффинная хроматография является одним из обычно предпочтительных этапов очистки.

По отношению к антителам, возможность использования белка А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изотипа Fc-домена иммуноглобулина, присутствующего в составе антитела. Белок А можно использовать для очистки антител, основанных на тяжелых цепях $\gamma 1$, $\gamma 2$ или $\gamma 4$ человека (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)).

Белок G рекомендуется для всех изотипов мыши и для $\gamma 3$ человека (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5:15671575 (1986)). Матрикс, к которому присоединяют аффинный лиганд, чаще всего представляет собой агарозу, однако также доступны и другие матриксы. Механически устойчивые матриксы, например, стекло с контролируемым размером пор или поли(стиролдивинил)бензол дает возможность достижения более высоких скоростей потока и более короткого времени обработки, чем при использовании агарозы. Если антитело содержит C_{H3} -домен, для очистки можно использовать смолу Bakerbond ABXTM (J. T. Baker, Филлипсбург, штат Нью-Джерси). Кроме того, в зависимости от антитела, подлежащего очистке, доступны другие методики очистки белка, например, фракционирование на ионообменной колонке, преципитация с этанолом, обращенно-фазная ВЭЖХ, хроматография на гепарин-SEPHAROSETM, хроматография на анионно-или катионообменной смоле (например, на колонке с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, электрофорез в ДСН-ПААГ и преципитация с сульфатом аммония. Специалист в данной области техники должен понимать, что многие из этих методик, пригодных для выделения антител, можно применять для выделения других двцепочечных белков, например, секреторных белков.

[0265] В общем, различные методики для получения антител для использования в исследованиях, испытаниях и клинических исследованиях хорошо известны в данной области техники в соответствии с вышеописанными методиками и/или, по мнению специалиста в данной области, для конкретного представляющего интерес антитела.

Примеры

[0266] Настоящее изобретение будет более понятным при рассмотрении следующих примеров. В то же время эти примеры не следует рассматривать как ограничивающие объем настоящего изобретения. Следует понимать, что примеры и варианты реализации, описанные в настоящем документе, предназначены только для иллюстративных целей, и в их свете специалисты в данной области техники могут предложить различные модификации или изменения, которые должны входить в рамки настоящей заявки и прилагаемой формулы изобретения.

[0267] Сокращения: Сокращения: Ат (антитело), пАт (полуантитело), НС (тяжелая цепь), ImmTAC (иммуномобилизующий моноклональный Т-клеточный рецептор против рака), IPTG (изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид), LC (легкая цепь), ОП (оптическая плотность), ОРС (открытая рамка считывания), ОТР (скорость переноса кислорода), OUR (скорость поглощения кислорода), Tg (температура при фазе роста), Tr (температура при фазе образования продукта), TIR (область инициации трансляции), xIL4 (антитело против интерлейкина-4), xIL13 (антитело против интерлейкина-13), xIL17 (антитело против интерлейкина-17) и xIL33 (антитело против интерлейкина-33).

Пример 1: Влияние уровней шаперона и оксидоредуктазы на титр продукции полуантитела

[0268] Получение гетерологичных секретируемых белков с использованием рекомбинантных методик имеет важное значение для многих терапевтических молекул. Полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) являются одним из неограничивающих примеров гетерологичных секретируемых белков с большим количеством важных вариантов терапевтического применения, например, при

иммунотерапии рака и в других областях. Получение полиспецифических антител для терапевтического применения требует возможности продуцировать строительные блоки этих антител, например, полуантител (пАт), в промышленных масштабах. Для удовлетворения этой потребности в настоящем документе предложены

- 5 оптимизированные экспрессирующие векторы и этапы процесса, обеспечивающие значительное увеличение получения по сравнению со стандартными способами. Важно отметить, что установлено, что одиночная плаزمиды или система совместимых плазмид для совместной экспрессии тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC) пАт в комбинации с шаперонными белками FkpA, DsbA и DsbC значительно усиливает продукцию собранных
- 10 пАт. Систему протестировали и обнаружили, что она позволяет улучшить продукцию нескольких пАт, что демонстрирует возможность ее широкого применения для получения многих секретируемых белков. Последующая оптимизация этапов процесса (включая, например, скорость перемешивания, pH, промотор FkpA и температуру культуральной среды в различных фазах культивирования) привела к еще более
- 15 значительному увеличению выхода продукта.

Материалы и способы

Конструирование вектора полуантитела (пАт)

- [0269] Векторы конструировали аналогично описанию в EP1356052. В частности, получили различные экспрессирующие векторы для экспрессии пАт. Для каждого
- 20 вектора клонировали экспрессирующую кассету в сайте EcoRI на платформе плазмиды pBR322 *E. coli* (Sutcliffe, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43:77-90, 1978). Каждая экспрессирующая кассета содержала по меньшей мере следующие компоненты: (1) phoA-промотор для контроля транскрипции (Kikuchi et al., Nucleic Acids Res. 9:5671-5678, 1981); (2) последовательность Шайна-Дальгарно из *trp E. coli*, сигнальную
- 25 последовательность термостабильного энтеротоксина II (STII) или комбинацию этих обоих элементов для инициации трансляции (Chang et al., Gene 55: 189-196, 1987); и (3) λ t0-терминатор для окончания транскрипции (Scholtissek and Grosse, Nucleic Acids Res. 15:3185, 1987). Кроме того, сигнальная последовательность STII или молчащие кодонные варианты этой сигнальной последовательности предшествовали кодирующей
- 30 последовательности легкой или тяжелой цепи. Эта последовательность контролирует секрецию полипептида в периплазму (Picken et al., Infect. Immun. 42:269-275, 1983; и Simmons and Yansura, Nature Biotechnology 14:629-634, 1996).

- [0270] Для независимой экспрессии генов легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина разработали векторы с отдельными цистронами. В таких векторах цистронная единица
- 35 каждой цепи находилась под контролем своего промотора PhoA и заканчивалась λ t0-терминатором. Кроме того, каждый цистрон содержал TIR (область инициации трансляции) для модуляции экспрессии легкой и тяжелой цепей (Simmons et al., J. Immunol. Meth., 263:133-147, 2002). В типичном варианте реализации экспрессирующая кассета содержала от 5' к 3' первый PhoA-промотор, затем цистрон легкой цепи (TIR-L+легкая
- 40 цепь) и первый λ t0-терминатор и второй PhoA-промотор с последующим цистроном тяжелой цепи (TIR-H+тяжелая цепь) и второй λ t0-терминатор. В качестве альтернативы, экспрессирующая кассета содержала от 5' к 3' первый PhoA-промотор, затем цистрон тяжелой цепи (TIR-H+тяжелая цепь) и первый λ t0-терминатор и второй PhoA-промотор с последующим цистроном легкой цепи (TIR-L+легкая цепь) и второй λ t0-терминатор.
- 45 Как TIR-L, так и TIR-H содержались внутри сигнальной последовательности STII или ее варианта.

[0271] Для векторов, экспрессирующих IgG4-пАт xIL13 и xIL4, оценивали комбинации TIR 1,1 и 2,2. Для векторов, экспрессирующих IgG4-пАт xIL17 и xIL33, оценивали TIR

2.2. Первая цифра представляет эффективность TIR легкой цепи, а вторая - эффективность TIR тяжелой цепи. В дополнение к IgG4-пАт xIL13, xIL4, xIL17 и xIL33, сконструировали и протестировали другие векторы пАт изотипа IgG1.

Конструирование плазмиды, экспрессирующей шаперон

[0272] Для определения возможности объединения экспрессии шаперона с вышеописанными векторами с целью получения высоких титров пАт xIL13, xIL4, xIL17 и xIL33 предложили плазмиды для совместной экспрессии. Протестировали ряд известных шаперонов, включая белок FkpA, пептидилпролил-цис-транс-изомеразу с активностью шаперона. Для этого сконструировали совместимые плазмиды (pACYC, Novagen, Мэдисон, штат Висконсин), содержащие ОРС FkpA, как описано в EP1356 052 (см., например, Примеры 9-10, в частности, абзац [0207]).

[0273] Развивая эту работу для данного способа, аналогичным образом получили набор FkpA-совместимых векторов для модулирования уровня совместной экспрессии FkpA. Модулирования уровней FkpA достигали путем оптимизации сигнального пептида, как описано выше (Simmons and Yansura, *supra*, 1996). Вкратце, 5'-конец ОРС FkpA содержал сигнальный пептид FkpA (нативный или вариантный), либо сигнальный пептид STII. Все конструкторы вариантных генов FkpA находились под контролем промотора tacII.

[0274] Затем эти плазмиды трансформировали совместно с плазмидами, экспрессирующими пАт, описанными выше, в штамм 66F8. Генотип штамма-хозяина 66F8 представлял собой W3110 $\Delta fhuA \Delta phoA ilvG2096 (Val^r) \Delta prc spr43H1 \Delta degP \Delta manA lacI^Q \Delta ompT \Delta menE$.

[0275] Для пАт xIL13 сконструировали плазмиды с TIR1,1 и TIR2,2, кодировавшие LC и HC полуантитела и FkpA, и использовали их для трансформации 66F8. В этих плазмидных конструкторах экспрессия FkpA находилась под контролем phoA-промотора, расположенного выше ОРС LC. Плазмиду pBR322 обычно поддерживали при копийности приблизительно 30 копий/клетку (Bolivar et al., *Gene*, 2: 95-113, 1977), и плазмиду pACYC обычно поддерживали при копийности приблизительно 15 копий/клетку (Chang and Cohen, *J. Bacteriol.*, 134: 1141-1156, 1978). Безотносительно к теоретическим представлениям считается, что увеличение числа копий при переносе FkpA на плазмиду для экспрессии Ат может привести к увеличению полученного количества FkpA.

Конструирование плазмиды оксидоредуктазы

[0276] Аналогично системе совместимых плазмид, описанной для совместной экспрессии FkpA, совместимые плазмиды использовали для скрининга различных известных оксидоредуктаз в комбинации с плазмидой, экспрессирующей пАт, содержащей один из ранее описанных вариантов TIR FkpA. Эту работу выполнили с использованием плазмиды с TIR2,2 с идентификатором rxIL13.2.2.FkpAc13. Кроме того, совместимые плазмиды использовали для скрининга FkpA и оксидоредуктаз в комбинации с xIL4 и другими IgG1-пАт.

[0277] Конструирование совместимых плазмид исходных оксидоредуктаз осуществляли согласно описанию в 1356052 EP (см., например, Пример 9). Скрининг оксидоредуктаз включал экспрессию с совместимой плазмиды JJ247 с плазмидой xIL13.2.2.FkpAc13 для экспрессии пАт. В примере с пАт xIL13 экспрессию оксидоредуктаз индуцировали с помощью 1 mM IPTG или не индуцировали с целью модулирования уровней оксидоредуктаз.

[0278] Кроме того, сконструировали одиночные плазмиды, кодирующие LC и HC пАт и шапероны FkpA, DsbA и DsbC, и использовали их для трансформации 66F8. В

примере с пАт xIL13 сконструировали две одиночных плазмиды с TIR2,2 и различными промоторами, использовавшимися для контроля экспрессии FkpA. Одиночная плазида MD157 содержала rhoA-промотор для экспрессии FkpA, а плазида KA01 содержала tacII-промотор. Использование различных промоторов обеспечило дополнительное модулирование экспрессии FkpA. В примере с пАт xIL17 сконструировали одиночную TIR2,2-плазмиду (MD341), использовавшую rhoA-промотор для экспрессии FkpA. Во всех случаях использования одиночных плазмид экспрессия DsbA и DsbC находилась под контролем tacII-промотора в нескольких цистронах. В примере с пАТ xIL4 сконструировали одиночную TIR2,2 плазмиду с идентификатором CB1, содержащую OPC совместимой плазмиды AH8145 шаперонов, описанной ниже.

[0279] В дополнение к системе одиночной плазмиды, описанной выше, выполнили оценку системы совместимых плазмид трех шаперонов с рядом пАт изотипов IgG1 и IgG4. В системе совместимых плазмид один из вариантов TIR FkpA, описанный ранее, клонировали в полицистронной совместимой плазмиде DsbA и DsbC (JJ247) с идентификатором AH8145.

Процесс ферментации

[0280] Крупномасштабное производство фактически выполняли, как описано в EP1356052 (см., например, Пример 4 и абзацы [0159]-[160]). Для каждой ферментации в объеме 10 л размораживали 0,5 мл замороженной исходной культуры (содержащей 10-15% ДМСО) и использовали для инокуляции 2-л качалочных колб, содержащих 500 мл соевой LB-среды с добавлением 0,5 мл раствора (5 мг/мл) тетрациклина и/или 2 мл раствора канамицина (5 мг/мл) и 2,5 мл 1 М раствора фосфата натрия. Этот инокулят выращивали приблизительно 16 часов при 30°C при встряхивании, а затем использовали для инокуляции 10-литрового ферментера.

[0281] Ферментер первоначально содержал приблизительно 7,0 литров среды, содержавшей 1,1 г глюкозы, 100 мл 1 М сульфата магния, 10 мл раствора микроэлементов (100 мл соляной кислоты, 27 г гексагидрата хлорида железа (III), 8 г гептогидрата сульфата цинка, 7 г гексагидрата хлорида кобальта, 7 г дигидрата молибдата натрия, 8 г пентагидрата сульфата меди (II), 2 г борной кислоты, 5 г моногидрата сульфата марганца в конечном объеме 1 литр), 20 мл раствора тетрациклина (5 мг/мл в этиловом спирте) или 250 мл раствора ампициллина (2 мг/мл), 1 пакет солей HCD (37,5 г сульфата аммония, 19,5 г двухосновного фосфата калия, 9,75 г дигидрата одноосновного фосфата натрия, 7,5 г дигидрата цитрата натрия, 11,3 г одноосновного фосфата калия), 200 г сои-BL4 (гидролизата белка сои) и 100 граммов дрожжевого экстракта. Ферментацию первоначально выполняли при 30°C при расходе воздуха 20 стандартных литров в минуту (с.л/мин) и контролировали при pH 7,0 ± 0,2 (хотя в некоторых случаях происходили случайные выходы за пределы этого диапазона). В ферментере поддерживали противодавление 1 бар, первоначально устанавливали скорость перемешивания 650 об/мин. Как подробно обсуждается ниже в примере 2, можно менять скорость перемешивания с целью манипулирования скоростью переноса кислорода в ферментер и, следовательно, контроля скорости дыхания клеток. Кроме подробного обсуждения в примере 3 ниже, можно корректировать температуру во время ростовой и продуктивной фаз с целью максимизации выхода продукта.

[0282] После инокуляции ферментера средой из качалочной колбы, содержащей клетки, культуру выращивали в ферментере до высокой плотности клеток с использованием компьютерного алгоритма подачи концентрированного раствора глюкозы в ферментер. Кроме того, в ферментер подавали гидроксид аммония (58% раствор) и серную кислоту (24% раствор) при необходимости контроля pH. В некоторых

случаях для контроля пенообразования также добавляли пеногаситель L-61.

[0283] По достижении культурой плотности клеток приблизительно 40 ОП₅₅₀ в ферментер добавляли еще 100 мл 1 М сульфата магния. Кроме того, по достижении культурой приблизительно 20 ОП₅₅₀ в ферментер добавляли концентрированную солевую добавку (12,5 г сульфата аммония, 32,5 г двухосновного фосфата калия, 16,25 г дигидрата одноосновного фосфата натрия, 2,5 г дигидрата цитрата натрия, 18,75 г одноосновного фосфата калия, 10 мл 2,7% хлорида железа (III) и 10 мл микроэлементов в окончательном объеме 1250 мл) с начальной скоростью 2,5 мл/мин и продолжали до внесения приблизительно 1250 мл в ферментационную среду. Ферментацию обычно продолжали в течение 70-80 часов.

Пробоподготовка для электрофореза, иммуноблоттинга и ВЭЖХ-анализа

[0284] Подготовка невосстановленного растворимого образца была аналогична описанной в EP1356052 (см., например, Пример 4, в частности, абзац [0162]). В частности, невосстановленные растворимые образцы подготавливали следующим образом: замороженные 1-мл образцы цельной жидкой среды, отобранные в ходе ферментации, размораживали при комнатной температуре. 100 мкл размороженной цельной жидкой среды добавляли к 500 мкл буфера для экстракции. (Буфер для экстракции: 10 мМ трис, рН 6,8, 5 мМ ЭДТА, свежедобавленные 0,2 мг/мл лизоцима куриного яйца и свежеприготовленная иодуксусная кислота до конечной концентрации 5-10 мМ.) Образцы цельной жидкой среды с буфером для экстракции инкубировали на льду в течение 5-10 минут, затем обрабатывали ультразвуком (2×10 импульсов), затем центрифугировали при 4°C и 14000 об/мин в течение 15-20 минут. Супернатант извлекали как растворимую фракцию. Для анализа электрофорезом в ДСН-ПААГ и иммуноблоттинга растворимую фракцию разбавляли в соотношении 1:10 в 2 X трициновом буфере Novex для образцов без восстановителя. 10 мкл этого состава загружали в 10-луночный Novex 10% бис-трис NuPage гель и подвергали электрофорезу при 150 В с MES-буфером. Затем гель использовали для иммуноблоттинга или окрашивали кумасси синим.

[0285] Образцы растворимых фракций были представлены для LC-каппа/-RP анализа. Этот анализ представлял собой 2-мерную ВЭЖХ, где первая колонка являлась аффинной колонкой, которая захватывает каппа-легкую цепь, содержащую IgG-компоненты, а вторая колонка представляла собой обращенно-фазную колонку. Встроенную станцию ВЭЖХ настроили на двухколоночный режим. Резервуары с растворителем представляли собой: Растворитель 1А, буфер для аффинной загрузки; растворитель 1В, буфер для аффинного элюирования, 0,2% ТФУК в воде; растворитель 2А, водный обращенно-фазный буфер, 0,1% ТФУК в воде; растворитель 2В, органический элюирующий обращенно-фазный буфер, 0,1% ТФУК в 80% ацетонитриле. Первая колонка представляла собой аффинную колонку POROS[®] CaptureSelect[™] LC-каппа (2,1×30 мм), приобретенную в Life Technologies (Карлсбад, штат Калифорния). Все процедуры, связанные с аффинной колонкой, выполняли при комнатной температуре.

[0286] Вторая колонка представляла собой обращенно-фазную колонку POROS[®] R2 20 мкм (2,1×30 мм), приобретенную в Life Technologies (Карлсбад, штат Калифорния). Температуру обращенно-фазной колонки поддерживали при 80°C.

[0287] Аффинную колонку уравнивали буфером для загрузки и загружали образец при скорости потока 2 мл/мин. Элюат направляли в отходы. После загрузки образца аффинную колонку промывали буфером для загрузки (3 мл) для снижения количества неспецифически связанных компонентов. Затем посредством переключения клапана

аффинную колонку подключали к обращенно-фазной колонке и элюировали буфером для элюирования (5 мл) со скоростью потока 2 мл/мин для переноса аффинно захваченных компонентов в обращенно-фазную колонку. Во время этого переноса после аффинной колонки и перед обращенно-фазной колонкой помещали встроенный

5 УФ-детектор, тем самым выполняя мониторинг элюирования аффинной колонки, которая обеспечивала загрузку обращенно-фазной колонки. После элюирования и отключения от обращенно-фазной колонки аффинную колонку промывали водой (2 мл), и затем повторно уравнивали буфером для загрузки (4 мл).

[0288] Загруженную обращенно-фазную колонку промывали 0,1% водным раствором

10 ТФУК (1,1 мл). Скорость потока устанавливали на 2 мл/мин и запускали быстрый градиент (0,25 мин) до 35% растворителя 2В (0,1% ТФУК/80% ацетонитрил), а затем пологий градиент до 50% растворителя 2В в течение 3 мин. Элюирование выполняли градиентом до 100% растворителя 2В в течение 0,5 мин и поддерживали в течение 1,5 мин. Затем обращенно-фазную колонку восстанавливали до исходных условий в течение

15 0,05 мин и поддерживали в течение 2 мин до повторного уравнивания. Мониторинг элюата колонки выполняли при длине волны 280 и 214 нм. Количественное определение выполняли путем сравнения областей объединенных пиков с аналогичными областями стандартных известных концентраций на основании разделения в обращенно-фазной колонке.

[0289] Кроме того, выполняли количественную оценку растворимых и общих LC и НС, продуцированных в процессе ферментации. Для выполнения количественной оценки общей фракции ОФ-ВЭЖХ образцы ферментационной среды 10-кратно разбавляли 100 мМ DL-дитиотрейтолом (№ по каталогу Sigma. 43816) в 6 М гуанидин-НСl, 360 мМ трис, 2 мМ ЭДТА, рН 8,6) 200 мМ. Образцы встряхивали на вортексе, инкубировали

25 при 60°C в течение 20 минут и центрифугировали при 13000 об/мин, 4°C в течение 15 мин. Растворимую фракцию фильтровали с помощью 0,22-мкм фильтра перед инъекцией в ВЭЖХ. Используемая система ВЭЖХ представляла собой систему Agilent Technologies 1290 Infinity. Образцы вводили в аналитическую колонку быстрого разрешения Zorbax 300SB-C3 Rapid Resolution (4.6×150 мм, 3,5 мкм) (№ по каталогу 863973-909). Подвижная

30 фаза А состояла из 0,1% трифторуксусной кислоты (№ по каталогу Thermo. 28901) в SQH₂O, а подвижная фаза В - 0,08% трифторуксусную кислоты в ацетонитриле для ВЭЖХ (№ по каталогу Honeywell. АН015-4).

[0290] Для выполнения количественной оценки растворимой фракции ОФ-ВЭЖХ образцы ферментационной среды гомогенизировали (10000 об/мин) и четырежды

35 обрабатывали ультразвуком (амплитуда 88%) в течение 10 с с использованием Pro-Scientific DPS-20. Затем образцы центрифугировали при 4°C и 14000 об/мин в течение 15-20 минут. Супернатант извлекали как растворимую фракцию, денатурировали и обрабатывали на ОФ-ВЭЖХ, как описано выше.

Результаты

Влияние экспрессии FkpA на титр ПАТ

[0291] Как показано на **фиг. 1А**, продукция субъединиц легкой и тяжелой цепей с TIR1,1-вектора ПАТ xIL13 привела к получению общего количества легкой и тяжелой цепи, равного 2,9 г/л и 1,2 г/л, соответственно. При использовании TIR2,2 общее количество продуцированных легкой и тяжелой цепей составило 6,4 г/л и 4.1 г/л,

45 соответственно.

[0292] Однако общее количество продуцированных субъединиц не привело к значительному накоплению растворимых субъединиц. При использовании TIR1,1-плазмиды ПАТ xIL13 общее количество продуцированных растворимых легкой и тяжелой

цепей составило 0,2 г/л и менее 0,1 г/л, соответственно (фиг. 1В). Для пАт при использовании TIR2,2 общее количество продуцированных растворимых легкой и тяжелой цепи составило 0,3 г/л и 0,3 г/л, соответственно (фиг. 1С). Титр собранных тАт хIL13 для ферментации с TIR1,1 составил лишь 0,1 г/л, а для ферментации с TIR2,2 - менее 0,2 г/л (фиг. 2). Эти результаты указывают на неэффективность фолдинга и/или сборки тАт-продукта. Поэтому выполнили дополнительную работу по оценке влияния использования плазмид с TIR1,1 и TIR2,2 с совместной экспрессией шаперонов на титр.

[0293] Известно, что несколько классов шаперонных белков способствуют фолдингу и сборке белков (фиг. 3А-В). Особый интерес вызывают шапероны FkpA, известный как пептидил-пролил-цис-трансизомераза и шаперон, и DsbA и DsbC, известные как оксидоредуктазы. Выполнили эксперименты с целью проверки наличия влияния экспрессии FkpA, DsbA и DsbC на продукцию пАт.

[0294] В частности, рассмотрели влияние экспрессии FkpA с использованием отдельной плазмиды (системы совместимых плазмид) или одной и той же плазмиды (система одиночной плазмиды), кодирующей ОРС НС и LC пАт (фиг. 4А-В). Использование одиночной экспрессирующей плазмиды избавляет от необходимости использовать несколько антибиотиков или других средств селективного давления для сохранения плазмиды. В системе одиночной плазмиды, используемой для пАт хIL13, заменили промотор, под контролем которого находится экспрессия FkpA, с IPTG-индуцибельного промотора tacII на промотор rhoA. Таким образом, истощение фосфата в культуральной среде приводило к экспрессии НС, LC и FkpA.

[0295] Повышение уровня совместной экспрессии шаперона FkpA коррелировало с повышенным количеством накопленных растворимых мономерных тяжелых цепей в дополнение к повышенному количеству собранных пАт для пАт изотипа IgG1 (хVEGF) (фиг. 5А). В этом эксперименте выполнили скрининг набора вариантов экспрессии FkpA, как описано ранее, с индукцией посредством 1 мМ IPTG. Без совместной экспрессии FkpA титр пАт хVEGF составлял 0,2 г/л, а при высоком уровне совместной экспрессии FkpA (FkpA(д.т.)) титр пАт составлял приблизительно 0,4 г/л (фиг. 5В).

[0296] Для продукции пАт хIL13 протестировали систему совместимых плазмид (при экспрессии хIL13 НС и LC с одной плазмиды и FkpA - с другой, как показано на фиг. 4А) с использованием экспрессирующего вектора с TIR1,1 или TIR2,2. Для системы совместимых плазмид, индуцируемых с помощью 1 мМ IPTG для контроля совместной экспрессии FkpA, титр при использовании плазмиды с TIR1,1 составил 0,2 г/л, а при использовании плазмиды с TIR2,2 - 0,4 г/л (фиг. 6А, дорожки 3 и 4). Это привело к приблизительно двукратному увеличению титра по сравнению с использованием TIR1,1 и TIR2,2 с эндогенными уровнями FkpA (фиг. 6А, дорожки 1 и 2). На фиг. 6В показан уровень экспрессии FkpA, индуцируемой в системе совместимых плазмид по сравнению с эндогенной экспрессией, измеряемый посредством сверхэффективной жидкостной хроматографии (СЭЖХ) в миллиединицах поглощения (МОП) и вестерн-блоттинга.

[0297] Кроме того, протестировали систему одиночной плазмиды для экспрессии FkpA и продукции пАт, показанную на фиг. 4В. Титры пАт хIL13 при использовании одиночной плазмиды с TIR1,1 и TIR2,2 составили 0,4 г/л и 0,7 г/л, соответственно (фиг. 6А). Это представляет собой приблизительно двукратное увеличение титра по сравнению с системой совместимых плазмид. Уровень экспрессии FkpA в системе одиночной плазмиды также был приблизительно в два раза выше, чем в индуцируемой системе совместимых плазмид (фиг. 6В). Повышение уровня экспрессии FkpA коррелировало с повышенным количеством накопленных растворимых мономерных тяжелых при использовании обеих TIR.

[0298] Третье пАт (xIL4 IgG4) протестировали с использованием TIR1,1 и TIR2,2 с индуцированной совместной экспрессией FkpA с системы совместимых плазмид. В данном эксперименте совместная экспрессия FkpA (д.т.) повышала количество растворимой мономерной тяжелой цепи при использовании обеих TIR (фиг. 7А), но не

приводила к увеличению титра продуцированных пАт (фиг. 7В).
 [0299] Четвертое пАт (xVEGFC IgG1) протестировали с использованием индуцированной совместной экспрессии FkpA с системы совместимых плазмид. В данном эксперименте совместная экспрессия FkpA (д. т.) повышала количество растворимой мономерной тяжелой цепи и увеличивала титр с 0,5 г/л до 0,8 г/л (фиг. 8А). Увеличение экспрессии FkpA, определяемой окрашиванием кумасси (фиг. 8В), коррелировало с увеличением уровня накопленной растворимой мономерной НС (фиг. 8С). В целом эти результаты показывают, что экспрессия FkpA усиливала накопление растворимой мономерной тяжелой цепи, однако влияние на титр собранного пАт было переменным. Это указывает на желательность дальнейшей оптимизации.

Влияние экспрессии DsbA и DsbC на титр пАт

[0300] Продукцию пАт xIL13 дополнительно оптимизировали путем объединения pхIL13.2.2.FkpAc13 (одиночная плаزمид), описанной выше, с совместимой плазмидой для экспрессии ферментов DsbA и DsbC (фиг. 9). Плазмиды, экспрессирующие DsbA и DsbC (JJ247) с pхIL13.2.2.FkpAc13, повышала титр пАт. На фиг. 10 показан титр пАт xIL13, продуцированного в зависимости от времени в присутствии и в отсутствие IPTG-индукции DsbA и DsbC. Максимальный титр для pхIL13.2.2.FkpAc13 с JJ247 достигался при ферментации в течение 52 часов. В этот момент времени в условиях без IPTG (без индукции) титр xIL13 составлял $1,2 \pm 0,2$ г/л, а в условиях с IPTG (индуцированное состояние) титр xIL13 составлял $1,0 \pm 0,2$ г/л (фиг. 10). Снижение титра в период с 52 до 72 часов при обоих протестированных условиях являлось значительным и было обусловлено снижением скорости поглощения кислорода (OUR) и ростом осмотического давления во время процесса ферментации, как описано в примере 2.

[0301] Кроме того, выполнили оценку совместимой системы для экспрессии DsbA, DsbC и FkpA (АН8145) с использованием плазмид для экспрессии Ат xIL4 с TIR1,1 и TIR2,2 (фиг. 11А). Неиндуцированная совместная экспрессия всех трех шаперонов привела к получению титра при использовании TIR1,1 и TIR2,2, равного 0,8 г/л и 1,2 г/л, соответственно (фиг. 12, дорожки 5 и 6). Это представляло собой приблизительно шестикратное увеличение титра при использовании TIR2,2 по сравнению с ранее описанными условиями с FkpA и совместимой плазмидой с TIR2,2 (фиг. 12, дорожки 3 и 4).

[0302] Выполнили оценку неиндуцированной системы совместимой плазмиды АН8145 при продукции еще одного пАт. Использование вектора на основе TIR2,2 для продукции IgG1-пАт xVEGFC с неиндуцированной совместимой плазмидой АН8145 повышало титр с 0,8 г/л до 1,0 г/л по сравнению с совместной экспрессией только FkpA (фиг. 13).

Пятое пАт (xVEGFA IgG1) протестировали с использованием TIR1,1 и TIR2,2 и совместимой плазмиды АН8145. Без совместной экспрессии шаперона титры при использовании TIR1,1 и TIR2,2 были аналогичны и составляли около 0,9 г/л (фиг. 14, дорожки 1 и 3). При использовании совместимой плазмиды АН8145 без индукции с плазмидами с TIR1,1 и TIR2,2 титр составил 1,2 г/л и 1,7 г/л, соответственно (фиг. 14, дорожки 2 и 4).

[0303] Получили одиночную плазмиду xIL4 с TIR2,2, содержащую ОРС шаперонов АН8145 (СВ1); ее создание проиллюстрировано на фиг. 11В. Плазмида СВ1 без добавления IPTG продуцировала несколько более высокие титры по сравнению с

системой совместимых плазмид (**фиг. 15**). Следует отметить, что титры пАт, зарегистрированные при этом сравнении, были получены в ходе ферментации с использованием стратегии оптимизированного перемешивания, как описано в примере 2. Согласно вестерн-блоттингу, уровни всех трех шаперонов при использовании СВ1 несколько увеличивались (**фиг. 15**). Безотносительно к теоретическим представлениям, система одиночной плазмиды может обеспечить большее количество копий плазмиды, что может привести к повышению выхода.

[0304] Систему одиночной плазмиды xIL13 MD157 сравнили с неиндуцированной системой совместимых плазмид rxIL13.2.2.FkpAc13 и JJ247 (**фиг. 16**). Одиночная плаزمида MD157 продуцировала титр, равный $2,1 \pm 0,3$ г/л, по сравнению с $1,9 \pm 0,04$ г/л для системы совместимых плазмид (**фиг. 17**). Следует отметить, что титры, зарегистрированные при этом сравнении, были получены в ходе ферментации с использованием стратегии оптимизированного перемешивания, как описано в примере 2.

[0305] Совместно эти результаты демонстрируют, что совместная экспрессия FkpA с DsbA и DsbC увеличивает продукцию собранных пАТ, при использовании нескольких конструктов для подтверждения этих эффектов.

Пример 2: Влияние поглощения кислорода на продукцию полуантитела

[0306] Вышеуказанные результаты демонстрируют улучшение продукции пАт за счет совместной экспрессии FkpA, DsbA и DsbC наряду с HC и LC пАт. Однако даже при этой усиленной получения обнаружено прекращение роста или даже снижение титра в моменты времени после 52 часов получения. Поэтому выполнили дополнительные эксперименты для дальнейшей оптимизации продукции пАт.

[0307] Как описано ранее, ферментации первоначально выполняли при 30°C при расходе воздуха 20 стандартных литров в минуту (с.л/мин) и контролировали при pH $7,0 \pm 0,2$. В ферментере поддерживали противодействие 1 бар, первоначально устанавливали скорость перемешивания 650 об/мин. Дополнительное противодействие привело к получению 200% начальной концентрации растворенного кислорода (dO_2). После падения сигнала dO_2 ниже 2% от начального уровня (обычно через 2 часа) в продуктивную культуру подавали концентрированный раствор глюкозы и продолжали эту подачу непрерывно в ходе ферментации, так что глюкоза являлась нелимитирующим питательным веществом.

[0308] Через 12 часов плотность клеток в культуре являлась достаточной для поддержания концентрации dO_2 , равной или приблизительно равной нулю процентов. Безотносительно к теоретическим представлениям считается, что при ограниченной концентрации кислорода скорость переноса кислорода (OTR) равна скорости поглощения кислорода (OUR) или скорости метаболизма клеток. Манипуляции с OTR облегчали, регулируя скорость перемешивания; эти манипуляции оказывали непосредственное влияние на OUR культуры. Для мониторинга состава отработанного газа при ферментации использовали масс-спектрометр, что позволило рассчитать скорость поглощения кислорода и образования углекислого газа при ферментации.

[0309] Как показано на **фиг. 18**, в системе плазмид rxIL13.2.2.FkpAc13 и JJ247, описанной выше, как индуцированные, так и неиндуцированные культуры TIR2,2 характеризовались пиковой OUR, равной 4,25 ммоль/л/мин через 12 часов, после чего dO_2 становилась лимитирующим фактором. Эти культуры выращивали при перемешивании с постоянной скоростью 650 об/мин. На **фиг. 19** показана осмоляльность этих культур с течением времени. Совместно **фиг. 18-19** показывают, что через 50 часов

OUR клеточной культуры резко снижалась, а осмоляльность росла.

[0310] На **фиг. 20** показан титр пАт xIL13, продуцированного в зависимости от времени в этих культурах. Наблюдали снижение титра с $1,2 \text{ г/л} \pm 0,2 \text{ г/л}$ в момент времени 52 часа до $0,7 \pm 0,04 \text{ г/л}$ в момент времени 72 часа. Аналогично, при индукции наблюдали

5 снижение титра с $1,0 \text{ г/л} \pm 0,2 \text{ г/л}$ в момент времени 52 часа до $0,5 \pm 0,05 \text{ г/л}$ в момент времени 72 часа. Интересно, что это снижение получения происходило в данных культурах одновременно с падением OUR и ростом осмоляльности.

[0311] Для смягчения снижения титра и устранения роста осмоляльности выполнили оценку изменения скорости перемешивания в момент времени 26 часов при

10 использовании TIR2,2 без индукции. Скорость перемешивания меняли с 650 об/мин до уровня, который позволял достичь целевого заданного значения OUR. Протестировали четыре различных целевых заданных значения OUR: приблизительно 1,5, 1,75, 2,0 и 2,5 ммоль/л/мин. Изменение скорости перемешивания при заданном значении между приблизительно 1,5 и 2,0 ммоль/л/мин устраняло падение OUR (**фиг. 21**) и рост

15 осмоляльности (**фиг. 22**).

[0312] Важно отметить, что при всех скоростях перемешивания на момент 54 часов титр был выше, чем без изменения скорости перемешивания (**фиг. 23**). При скорости приблизительно 2,5 ммоль/л/мин OUR падала приблизительно через ~60 часов (**фиг. 21**), а осмоляльность достигала пика 1200 мОсм через 72 часа (**фиг. 22**). На момент 72

20 часов при OUR приблизительно 2,5 ммоль/л/мин титр ($0,7 \text{ г/л}$) снижался до уровня, аналогичного уровню без изменения скорости перемешивания ($0,6 \pm 0,1 \text{ г/л}$). Средний титр при OUR приблизительно 2,0 ммоль/л/мин был максимальным ($2,4 \pm 0,6 \text{ г/л}$) из четырех протестированных условий; однако титр незначительно менялся и, по-видимому, наблюдалось некоторое снижение профиля OUR. OUR, равная приблизительно 1,5

25 ммоль/л/мин, позволяла получить воспроизводимые средние титры $2,1 \pm 0,3 \text{ г/л}$, однако при ней также наблюдалась некоторая изменчивость профиля OUR на поздних стадиях ферментации. OUR, равная приблизительно 1,75 ммоль/л/мин, характеризовалась как воспроизводимым титром ($1,8 \pm 0,2 \text{ г/л}$), так и постоянным трендом OUR, и поэтому ее выбрали в качестве предпочтительного заданного значения.

[0313] Эти результаты показывают, что изменение скорости перемешивания культур смягчало наблюдавшееся снижение OUR и увеличение осмоляльности. Важно отметить, что это изменение скорости перемешивания также обеспечивало увеличение титра

30 получения пАт, особенно на поздних этапах получения.

Пример 3: Влияние температуры на продукцию полуантитела

[0314] Хотя в предыдущих примерах продемонстрирован значительный прирост

35 продукции пАт, выполнены дополнительные тесты по дальнейшей оптимизации процесса продукции. Таким образом, для продукции пАт xIL13 в качестве отправной точки использовали высокопроизводительную систему одиночной плазмиды, описанную в примере 1, и заданное значение OUR приблизительно 1,75 ммоль/л/мин, описанное в

40 примере 2. Процесс дополнительно оптимизировали с целью существенного роста выхода продукции, как описано ниже.

[0315] Процесс ферментации согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения можно разделить на два различных этапа: фазу роста и фазу

45 образования продукта. В ростовой фазе большинство питательных веществ присутствуют в избытке, и плотность культуры быстро растет. В продуктивной фазе фосфат становится лимитирующим фактором, рост останавливается, и начинается экспрессия исследуемого продукта. Влияние температуры на продукцию пАт протестировали для каждой из этих фаз.

[0316] В комбинации с температурными экспериментами выполнили оценку второго хозяина. В этих экспериментах плазмиду MD157 трансформировали в хозяина для получения - штамм 67A6. Генотип штамма 67A6 представляет собой W3110 $\Delta fhuA \Delta phoA ilvG+ \Delta prc spr43H1 \Delta degP \Delta manA lacIQ \Delta ompT \Delta menE742 degPS210A$.

[0317] Штамм 67A6 содержит нокин протеаза-дефицитного аллеля гена *degP* (также известного как *htrA* и *ptd*), кодирующего DegP. DegP (также известный как протеаза Do) является периплазматической сериновой протеазой, необходимой для выживания при высоких температурах. Кроме того, DegP действует как молекулярный шаперон. Замена серина на аланин устраняет протеолитическую активность DegP, но не влияет на его шаперонную функцию (Spiess et al., Cell, 97:339-347, 1999).

[0318] Оптимизацию температуры выполнили как для ростовой фазы (Tg), так и для продуктивной фазы (Tr) для системы одиночной плазмиды xIL13 TIR2,2. На фиг. 24 показан рост культур при постоянной Tg/Tr, равной 30°C или 28°C. Постоянная Tg/Tr 28°C приводила к задержке скорости роста по сравнению с постоянной Tg/Tr 30°C. На фиг. 25 показана OUR культур, выращенных при этих температурах. Аналогично скорости роста, при росте культур при постоянной Tg/Tr 28°C наблюдалась задержка OUR по сравнению с 30°C.

[0319] Как показано на фиг. 26, при постоянной Tg/Tr 30°C фосфат заканчивался к моменту времени 22±2 часа. При сдвиге Tg/Tr до 28°C скорость роста культуры замедлялась, как описано выше, и время исчерпания фосфата смещалось к 26±2 часам.

[0320] На фиг. 27 показана продукция пАт xIL13 в этих культурах. Для каждого условия экспрессия продукта начиналась при исчерпании фосфата. Постоянная Tg/Tr, равная 28°C, позволяла достичь конечного титра 2,5 ± 0.2 г/л по сравнению с 1,3 ± 0.2 г/л при постоянной Tg/Tr, равной 30°C.

[0321] В рамках попытки увеличить время продуктивной фазы протестировали стратегию сдвига температуры. В этом эксперименте установили температуру ростовой фазы 30°C, и через 20 ч температуру сдвигали до 28°C. Профили роста (фиг. 28), фосфата (фиг. 29) и OUR (фиг. 30) в период от 0 до 20 часов были аналогичны для сдвига Tg 30/Tr 28°C и постоянной Tg/Tr 30°C.

[0322] Как показано на фиг. 31, сдвиг температуры к 28°C во время индукции продукта обеспечил дополнительное увеличение титра на 0,6 г/л при сравнении конечного титра 3,1 г/л при продукции в условиях Tg 30/Tr 28°C с конечным титром 2,5 г/л при продукции при постоянной Tg/Tr 28°C. Эти результаты продемонстрировали, что рост культуры при более высокой температуре, а затем снижение температуры культуры во время получения может привести к значительному усилению образования продукта.

[0323] Для определения оптимальных рабочих условий для получения пАт xIL13 с использованием штамма-хозяина 67A6 выполнено планирование частичного факторного эксперимента (DoE). При DoE уделяли внимание трем рабочим параметрам и уровню FkpA. Таблица 3-1. Параметры пАт xIL13

Картина	Темп. при фазе роста (Tg)	Темп. при фазе образования продукта (Tr)	pH	Промотор FkpA	Титр (г/л)
---+	30	28	6,7	phoA	2,8
0001	32	26,5	6,85	phoA	1,9
----	30	25	6,7	tac	1,4
---+	34	25	7	tac	2,9
---+	34	25	6,7	phoA	4,6
----	30	25	7	phoA	1,8
---+	30	28	7	tac	1,6
++++	34	28	7	phoA	2,8

++--	34	28	6,7	tac	1,6
0002	32	26,5	6,85	phoA	3,3

[0324] Как показано в таблице 3-1, рабочие параметры включали Tg и Tr, а также pH. Картина относится к рабочему диапазону определенного параметра; (-) относится к низкому значению параметра, (+) относится к высокому значению параметра, 0001 и 0002 относятся к среднему значению параметра. Tg находилась в диапазоне от 30 до 34 °C, Tr находилась в диапазоне от 25 до 28 °C, а pH находился в диапазоне от 6,7 до 7,0. Количество продуцированного FkpA модулировали за счет используемого промотора. Высокий уровень FkpA получали с phoA-промотора на MD157, а низкий уровень FkpA получали с неиндуцированного tac-промотора на KA01. Выполнили частичный факторный анализ по данным 10 экспериментов.

[0325] Как показано на **фиг. 32** эти факторы оказывали существенное влияние на титр полученного пАт xIL13. Титр пАт, продуцированный в условиях, использованных для DoE-экспериментов, описанных в таблице 3-1, варьировался от приблизительно 1,5 до приблизительно 4,5 г/л.

[0326] Одиночную плазмиду xIL4 (CB1) протестировали при оптимальных условиях ферментации, выявленных при DoE xIL13 (Tg 34°C, Tr 28°C, pH 7,0). Однако в условиях CB1 для контроля экспрессии FkpA использовали tacII-промотор без IPTG-индукции. Титр пАт xIL14 сравнили с условиями ферментации, при которых поддерживали постоянную Tg/Tr 30°C и постоянный pH 7,0. При новых условиях процесса без добавления IPTG титр пАт xIL4 увеличился с 1,3 г/л до 3,1 г/л (**фиг. 33**).

[0327] Для определения оптимальных рабочих условий для получения пАт xIL17 выполнено планирование частичного факторного эксперимента (DoE). Одиночную плазмиду MD341 сконструировали путем замены OPC LC и HC пАт xIL13 в одиночной плазмиде (MD157) на OPC LC и HC xIL17. Промоторы, используемые для экспрессии фрагментов антитела и шаперонов, были идентичны промоторам плазмиды xIL13 (MD157). При DoE уделяли внимание трем рабочим параметрам.

Таблица 3-2. Параметры пАт xIL17

Картина	Темп. при фазе роста (Tg)	Темп. при фазе образования продукта (Tr)	pH	Титр (г/л)
--	30	30	6,7	0,38
0001	32	27,5	7,0	2,0
---	30	25	6,7	2,5
--+	30	25	7,3	2,6
++	34	25	7,3	2,6
0002	32	27,5	7,0	1,9
++-	34	30	6,7	0,34
+--	34	25	6,7	2,0
+++	30	30	7,3	0,2
+++	34	30	7,3	0,12

[0328] Как показано в таблице 3-2, рабочие параметры включали Tg и Tr, а также pH. Tg находилась в диапазоне от 30 до 34°C, Tr находилась в диапазоне от 25 до 30°C, а pH находился в диапазоне от 6,7 до 7,3. На **фиг. 34** показано, что максимальный титр накопления достигался в условиях с Tr, равной 25°C.

[0329] На **фиг. 35** показано влияние совместной экспрессии первого оптимизирующего шаперонного белка с последующей оптимизацией фаз процесса (например, скорости перемешивания, Tg и Tr) на продукцию титра пАт xIL13. В типичном варианте реализации молекулярная оптимизация (например, экспрессия шаперонного белка и характеристики вектора) обеспечили приблизительно 16-кратное увеличение титра.

Этот уровень продукции в дальнейшем еще более увеличили (приблизительно в 3,5 раза) за счет развития процесса (например, скорости перемешивания, Tg и Tr). Совместно эти результаты демонстрируют, что можно достичь значительного прироста получения и надежности за счет оптимизации таких переменных, как экспрессия шаперона, системы векторов, скорость перемешивания, pH и температура роста/получения. В конечном итоге установлено, что Tg, равная 34°C, Tr, равная 25°C, pH 6,7 и уровень FkpA, продуцируемый rhoA-промотором, позволяли получить максимальный титр пАт xIL13.

Пример 4: Влияние штамма хозяина на продукцию полуантитела

[0330] Хотя в предыдущих примерах продемонстрирован значительный прирост продукции пАт, выполнены дополнительные тесты с целью исследования потенциальных различий продукции пАт у штаммов-хозяев 66F8 и 67A6. Таким образом, выполнили оценку высокопроизводительной системы одиночной плазмиды для продукции пАт, описанной в примере 1, сдвига OUR, описанного в примере 2, и сдвига температуры, описанного в примере 3, в двух штаммах-хозяевах *E. coli* 66F8 и 67A6. Генотип штамма 66F8 представляет собой W3110 Δ*fhuA* Δ*phoA* *ilvG*+ Δ*prc* *spr43H1* Δ*degP* Δ*manA* *lacIQ* Δ*ompT* Δ*menE742*. Генотип штамма 67A6 представляет собой W3110 Δ*fhuA* Δ*phoA* *ilvG*+ Δ*prc* *spr43H1* Δ*degP* Δ*manA* *lacIQ* Δ*ompT* Δ*menE742* *degPS210A*.

[0331] пАт xIL13 экспрессировали в обоих штаммах-хозяевах - 66F8 и 67A6. Ферментации выполняли в условиях сдвига температуры и скорости перемешивания, как описано выше. Использование штамма 67A6 привело к увеличению титра растворимого пАт xIL13 (фиг. 36А) и накопления общих субъединиц LC и HC по сравнению со штаммом 66F8 (фиг. 36В).

[0332] пАт xIL4 также экспрессировали в обоих штаммах-хозяевах - 66F8 и 67A6. При ферментации пАт xIL4 при постоянной температуре 30°C у обоих штаммов получили аналогичные титры, около равные 1,5 г/л (фиг. 37А). Однако при ферментации со снижением Tg с 34°C до Tr, равной 25°C штамм 67A6 продуцировал в среднем 3,0 г/л, а штамм 66F8 продуцировал в среднем 2,0 г/л (фиг. 37В). Кроме того, накопление общих субъединиц как LC, так и HC при ферментациях в 67A6 было более выраженным, чем при ферментациях в 66F8 с применением температурного сдвига (фиг. 38А и фиг. 38В).

[0333] Таким образом, как пАт xIL13, так и пАт xIL4 представляют собой два примера благоприятного влияния на титр за счет штамма-хозяина 67A6 и снижения температуры получения по сравнению с ростовой температурой. Безотносительно к теоретическим представлениям накопление рекомбинантного белка, по-видимому, достигало постоянного уровня в штаммах-хозяевах, не содержащих DegP, в то время как в штамме-хозяине с мутантным DegPS210A рекомбинантный белок, по-видимому, накапливался до окончания ферментации.

Пример 5: Продукция пАт xIL33 с использованием оптимизированного экспрессирующего вектора и оптимизированных условий культивирования

[0334] Плазмиду для экспрессии пАт xIL33 (MD501) сконструировали путем замены ОРС LC и HC пАт xIL13 в одиночной плазмиде (MD157) на ОРС LC и HC xIL33. Промоторы, используемые для экспрессии фрагментов антитела и шаперонов, были идентичны промоторам плазмиды xIL13 (MD157 (фиг. 39). Однократную ферментацию выполнили с использованием вектора для экспрессии пАт xIL33, содержавшего только ОРС для LC и HC xIL33 (MD481). Плазида MD481 не содержала ОРС для молекулярных шаперонов DsbA, DSBC или FkpA. Ферментацию выполнили при постоянной температуре 30°C, pH 7,0 и скорости перемешивания 650 об/мин (исходный случай фиг. 40). Затем выполнили однократную ферментацию с использованием вектора для экспрессии пАт xIL33, содержавшего ОРС для LC и HC xIL33, а также ОРС для

молекулярных шаперонов DsbA, DSBC или FkpA (MD501). При ферментации MD501 использовали те же рабочие условия, что и при ферментации MD481. Использование одиночной плазмиды (MD501) привело к приблизительно 10-кратному увеличению титра пАт xIL-33 по сравнению с исходным случаем.

[0335] Для определения оптимальных условий культивирования для получения пАт xIL33 с одиночной плазмиды MD501 выполнили планирование частичного факторного эксперимента (DoE). При DoE уделяли внимание четырем параметрам в 10 дробных факторных экспериментах, в том числе с повторными оценками двух центральных значений в штамме-хозяине 67A6 (Таблица 5-1). Сдвиг скорости перемешивания и температуры выполняли при ОП₅₅₀, равной 150.

Таблица 5-1. Параметры пАт xIL33

Картина	Темп. при ростовой фазе (Tg)	Темп. при фазе формирования продукта (Tr)	pH	Целевая OUR	Титр (г/л)
15	34	30	6,7	1,9	2,7
20	30	30	6,7	2,8	1,7
30	30	30	7,3	1,9	3,2
40	32	27,5	7,0	2,3	4,1
50	34	25	6,7	2,8	3,0
60	30	25	7,3	2,8	3,3
70	34	25	7,3	1,9	3,2
80	32	27,5	7,0	2,3	4,0
90	34	30	7,3	2,8	2,6
100	30	25	6,7	1,9	2,5

[0336] Как показано в таблице 5-1, Tg находилась в диапазоне от 30 до 34°C, Tr находилась в диапазоне от 25 до 30°C, pH находился в диапазоне между 6,7 и 7,3, а заданное значение OUR находилось в диапазоне от 1,9 до 2,8 ммоль O₂/л/мин. 41

показано, что условия центрального значения обеспечивали наиболее значимое благоприятное влияние на титр, причем максимальный достигнутый титр составил 4,0 ± 0,05 г/л, что представляет собой дальнейшее увеличение титра пАт по сравнению с исходными рабочими условиями (фиг. 40). Наилучшие условия культивирования включали pH 7,0, Tg 32°C, Tr 27,5°C (время изменения 2 ч), и целевое значение OUR приблизительно 2,3 ммоль/л/мин (время изменения скорости перемешивания 2 ч).

Пример 6: Оптимизация FkpA

[0337] В рамках попытки оптимизации уровня экспрессии FkpA протестировали два дополнительных варианта TIR FkpA в отдельных плазмидах для экспрессии пАт xIL13, xIL17 и xIL33 (плазмиды MD157, MD341 и MD501). Характеристики вариантов TIR FkpA исследовали, как описано при сравнении с сигнальной последовательностью эндогенного FkpA (фиг. 42). Плазмиды MD157, MD341 и MD501 содержали OPC для FkpAc13, что коррелировало с эффективностью TIR, равной трем (фиг. 43). В одиночных плазмидах MD157, MD341 и MD501 OPC FkpAc13 заменили OPC TIR1 или TIR2 FkpA и протестировали плазмиды при ранее выявленных оптимизированных условиях ферментации для каждого пАт.

[0338] Повышение уровня экспрессии FkpA коррелировало с повышенным накоплением пАт xIL13 (фиг. 44). Использование TIR1 и TIR2 FkpA привело к получению конечного количества FkpA, равного 0,5 и 2,5 г/л, и титров пАт xIL13, равных 1,5 и 2,5 г/л, соответственно. Применение TIR3 позволило получить 4 г/л FkpA и 3,8 г/л пАт. Уровни экспрессии FkpA также оказывали влияние на профили OUR в продуктивной фазе. В целом, титрование FkpA привело к около 3-кратному увеличению количества

продуцируемого пАт.

[0339] При ферментациях пАт xIL33 самый низкий профиль накопления титра коррелировал с использованием TIR1 FкрА и конечным титром, равным 2,4 г/л (фиг. 45). Использование TIR2 и TIR3 xIL33 привело к приблизительно 2-кратному увеличению титра пАт xIL33 (фиг. 45) по сравнению с использованием TIR1. Эти данные позволяют предположить, что повышение уровня FкрА оказывает благоприятное действие на продукцию пАт.

[0340] При ферментациях пАт xIL17 самый низкий профиль накопления титра коррелировал с использованием TIR1 FкрА и конечным титром, равным 2,0 г/л (фиг. 46).

[0341] При использовании описанных выше оптимальных условий для получения пАт xIL13 протестировали два дополнительных варианта TIR FкрА (TIR2.3 и TIR6). Профиль титра при использовании TIR2.3 отклонялся выше, чем при ранее протестированном использовании TIR2, однако уступал контрольному профилю TIR3 (фиг. 47А). Использование TIR6 позволило получить профиль накопления титра, аналогичный профилю для TIR2.3, который также уступал контрольному профилю TIR3. Накопление FкрА, определяемое с помощью вестерн-блоттинга, продемонстрировало титрование FкрА в зависимости от вариантов TIR (фиг. 47В). Эти данные позволяют предположить, что существует оптимальный уровень экспрессии FкрА, коррелирующий с продукцией пАт, который в случае пАт xIL13 (одиночная плазмида MD157) соответствует TIR3.

Пример 7: Влияние скорости переноса кислорода (OTR)

[0342] Наилучшие условия для продукции пАт xIL13, выявленные в примере 3, были также протестированы при использовании второй стратегии OTR. В экспериментах (n=3) противодавление в сосуде (BP) и скорость барботирования снизили с 1,0 до 0,3 бар и с 20 до 13 с.л/мин, соответственно. В рамках попытки восстановить потерю OTR в связи со снижением противодавления и скорости барботирования увеличили скорость перемешивания во время ростовой и продуктивной фаз с 650 до 880 об/мин и с 475 до 650 об/мин. Для достижения OTR, аналогичной значению в предыдущих примерах, можно применять различные комбинации противодавления в сосуде, скорости барботирования и скорости перемешивания.

[0343] Ферментации выполняли при постоянном BP в течение всего процесса ферментации. При измененной OTR противодавление поддерживали на уровне 0,3 бар (N=3), а в контрольных условиях противодавление поддерживали на уровне 1,0 бар (N=5). Ферментации выполняли при постоянном расходе воздуха в течение всего процесса ферментации. При измененной OTR расход воздуха поддерживали на уровне 13 с.л/мин (N=3), а в контрольных условиях расход воздуха поддерживали на уровне 20 с.л/мин (N=5). Ферментации выполняли при сдвиге скорости перемешивания при ОП₅₅₀, равной 150, как при изменении OTR, так и в контрольных условиях. При измененной OTR начальная скорость перемешивания составляла 880 об/мин, а после сдвига - 650 об/мин; в контрольных условиях начальная скорость перемешивания составляла 650 об/мин, а после сдвига - 475 об/мин.

Увеличение скорости перемешивания компенсировало падение OTR из-за снижения барботирования и противодавления. Изменение OTR привело к пиковой OUR и OUR в фазе образования продукта (фиг. 48А), а также профилям роста (фиг. 48В), аналогичным данным показателям в контрольных условиях. Изменение OTR привело к профилю накопления и максимальному титру ($4,1 \pm 0,4$ г/л), аналогичным данным показателям в контрольных условиях (фиг. 49).

Пример 8: Оптимизация продукции ImmTAC.

[0344] Иммуномобилизующие моноклональные Т-клеточные рецепторы против рака (ImmTAC) представляют собой двухцепочечные полипептиды согласно настоящему описанию, которые потенциально полезны для целого ряда противораковых терапий (см., например, Oates and Jakobsen, *OncoImmunology* 2:e22891, 2013 и Liddy et al., *Nat. Med.* 18:908-7, 2012). Как для мультиспецифических антител, необходимым условием для получения ImmTAC для терапевтического является способность продуцировать строительные блоки, такие как альфа- и бета-цепи TCR, и любые полипептиды, слитые с ними (например, анти-CD3 эффекторы, такие как scFv), в промышленном масштабе. Чтобы соответствовать этому требованию векторы экспрессии и этапы процесса были оптимизированы для достижения значительного увеличения производства по сравнению со стандартными способами. Важно отметить, что, как и в вышеприведенных примерах, было обнаружено, что экспрессия FkpA, изменения процесса, оптимизация TIR и экспрессия DsbC обеспечивали увеличение производства для нескольких ImmTAC.

Материалы и способы

[0345] Для векторов экспрессии ImmTAC (фиг. 50А), были оценены комбинации TIR 1,1; 1,2 и 2,3. Используемое в настоящем документе в отношении продуцирования ImmTAC, первое число обозначает прочность TIR альфа-цепи, а второе обозначает прочность TIR бета-цепи (фиг. 50В).

[0346] Плазмиды трансформировали в штамм-хозяин, 67А6, с генотипом W3110 $\Delta fhuA \Delta phoA \Delta ilvG2096$ (Val^f) $\Delta prc \Delta spr43H1 \Delta degP \Delta manA \Delta lacI^Q \Delta ompT \Delta menE \Delta degS210A$.

[0347] Первоначальные ферментации проводили при постоянной температуре, равной 30°C и pH 7,0 при изменении скорости перемешивания, инициированной в течение 24 часов, с циклом в 4 часа и ориентированной на OUR, равный приблизительно 1,75 ммоль/л /мин.

[0348] Была сконструирована совместимая плаزمида (pACYC, Novagen, Мэдиссон, штат Висконсин), содержащая ОРС для FkpA, как описано выше и в европейском патенте №. EP1356052 В1. Конструкция гена FkpA находилась под контролем промотора tacII.

[0349] Конструкция оригинальных плазмид, совместимых с оксидоредуктазой, была такой, как описано в Европейском патенте №. EP1356052 В1 (См., например, Пример 9). Скрининг оксидоредуктаз включал экспрессию из совместимой плазмиды JJ141 (DsbC), JJ142 (DsbA) и JJ247 (DsbA/C) с одиночной плазмидой ImmTAC TIR1,1 FkpA. Tac-промотор, используемый для управления экспрессией оксидоредуктаз, не индуцировался и экспрессия начиналась с промотора.

[0350] Для определения титра ImmTAC образцы растворимых фракций были представлены для LC-каппа/-RP анализа. Этот анализ представлял собой 2-мерную ВЭЖХ, где первая колонка являлась аффинной колонкой, которая захватывает каппа-легкую цепь, содержащую IgG-компоненты, а вторая колонка представляла собой обращенно-фазную колонку. Встроенную станцию ВЭЖХ настроили на двухколоночный режим. Резервуары с растворителем представляли собой: Растворитель 1А, буфер для аффинной загрузки; растворитель 1В, буфер для аффинного элюирования, 0,2% ТФУК в воде; растворитель 2А, водный обращенно-фазный буфер, 0,1% ТФУК в воде; растворитель 2В, органический элюирующий обращенно-фазный буфер, 0,08% ТФУК в ацетонитриле. Аффинная колонка представляла собой набитую под заказ колонку с использованием очищенного белка L, закупленного у Sigma Aldrich (штат Калифорния, США), связанного с активированной смолой POROS® AL, приобретенной у Life Technologies (штат Калифорния, США). Все процедуры, связанные с аффинной

колонкой, выполняли при комнатной температуре.

[0351] Вторая колонка представляла собой обращенно-фазную колонку HALO C4 (2,1×20 мм), приобретенную у Мас-Mod (штат Калифорния, США). Температуру обращенно-фазной колонки поддерживали при 80°C.

5 [0352] Аффинную колонку уравнивали буфером для загрузки и загружали образец при скорости потока 2 мл/мин. Элюат выливали. После загрузки образца аффинную колонку промывали буфером для загрузки для снижения количества неспецифически связанных компонентов. Затем посредством переключения клапана аффинную колонку
10 подключали к обращенно-фазной колонке и промывали буфером для элюирования со скоростью потока 2 мл/мин для переноса аффинно захваченных компонентов в обращенно-фазную колонку. Во время этого переноса за аффинной колонкой и перед обращенно-фазной колонкой помещали встроенный УФ-детектор, выполняя таким образом мониторинг элюата аффинной колонки (который загружался в обращенно-фазную колонку).

15 [0353] После элюирования аффинную колонку повторно уравнивали загрузочным буфером.

[0354] Загруженную обращенно-фазную колонку промывали 0,1% водным раствором ТФУК (1,1 мл). Скорость потока устанавливали на 2 мл/мин и запускали быстрый градиент (0,25 мин) до 5-30% растворителя 2В (0,08% ТФУК в ацетонитриле), а затем
20 пологий градиент до 34% растворителя 2В. Элюирование выполняли градиентом до 100% растворителя 2В. Мониторинг элюата колонки выполняли при длине волны 280 и 214 нм. Количественное определение выполняли путем сравнения областей объединенных пиков с аналогичными областями стандартных известных концентраций на основании разделения в обращенно-фазной колонке. Предел количественного
25 определения (ПКО) для этого метода составлял 0,0125 г/л.

Результаты

[0355] Первоначальная ферментация определяла качество TIR1,1 конструкции (фиг. 51). Условия были следующими: 30°C, pH 7,0 и OUR приблизительно 1,75 ммоль O₂/л/мин. Ферментация приводила к накоплению титра, равному 10 мг/л. Общее накопление
30 альфа- и бета-субъединицы составляло 550 и 800 мг/л, соответственно (фиг. 52).

[0356] Для определения возможности объединения экспрессии шаперона с вышеописанными векторами с целью получения высоких титров пАт xIL13, xIL4, xIL17 и xIL33 были предложены плазмиды для совместной экспрессии. Ряд известных шаперонов был протестирован в сочетании с экспрессией ImmTAC, включая белок
35 FкрА, пептидилпролил-цис-транс-изомеразу с активностью шаперона.

[0357] Затем совместимую с FкрА плазмиду ко-трансформировали с экспрессирующей плазмидой TIR1,1 ImmTAC 1, описанной выше (фиг. 53) в штамм 67A6. Условия ферментации были идентичны тем, которые использовались при первоначальной ферментации, описанной выше, и представлены на фиг. 51. Тас-промотор FкрА
40 индуцировали 1 mM IPTG, когда культура достигала 200 ОП₅₅₀. Анти-альфа и анти-бета растворимые вестерн-блоты указывают на увеличение накопления как альфа-, так и бета-растворимых субъединиц (растворимый восстановленный блот; фиг. 54А), в дополнение к собраным ImmTAC. Анализ титра также показал 2-кратное увеличение собранного ImmTAC по сравнению с состоянием без шаперона с конечным титром 20
45 мг/л (фиг. 54В).

[0358] Условия ферментационного процесса были изменены в последующих экспериментах ImmTAC (фиг. 55). Во всех последующих ферментациях скорость перемешивания была ориентирована на конкретную контрольную точку OUR, равную

приблизительно 2,5 ммоль O_2 /л/мин. Кроме того, температурный сдвиг осуществляли в течение 24 часов, что уменьшало температуру роста от 30°C до температуры производства 25°C.

[0359] Измененные условия процесса тестировали с использованием FkpA-совместимой системы, описанной выше, и они включали добавление 1 мМ IPTG при 200 ОП₅₅₀. Использование измененных условий процесса привело к приблизительно двукратному увеличению титра по сравнению с предыдущими условиями процесса с конечным титром 40 мг/л (фиг. 57).

[0360] Для ImmTAC TIR1,1; TIR1,2; И TIR2,3 была сконструирована и использована для трансформации 67A6 плазмиды, кодирующая альфа- и бета-цепи ImmTAC и FkpA (фиг. 58). В этих плазмидных конструктах экспрессия FkpA находилась под контролем rhoA-промотора, расположенного выше OPC LC. Плазмиду pBR322 обычно поддерживали при копийности приблизительно 30 копий/клетку (Bolivar et al., Gene, 2: 95-113, 1977), и плазмиду pACYC обычно поддерживали при копийности приблизительно 15 копий/клетку (Chang and Cohen, J. Bacteriol., 134: 1141-1156, 1978). Безотносительно к теоретическим представлениям считается, что увеличение числа копий при переносе FkpA на плазмиду для экспрессии Ат может привести к увеличению полученного количества FkpA.

[0361] Три варианта одиночной плазмиды ImmTAC TIR, содержащей OPC FkpA, давали более высокие титры, чем система FkpA, совместимая с TIR1,1, описанная ранее. Условия TIR1,2 и TIR 2,3 обеспечивали титры, равным приблизительно 50 мг/л каждый (фиг. 59A), в то время как условие TIR1,1 обеспечивали к титр, равный 65 мг/л (фиг. 59A). Общее накопление альфа- и бета-субъединицы для состояния TIR2,3 составляло 2,5 и 5,5 г/л, соответственно (фиг. 59B). В состоянии TIR1,1 суммарное накопление альфа- и бета-субъединиц составляло 1 г/л и 2,5 г/л, соответственно. В состоянии TIR1,2 накопление альфа- и бета-субъединицы составляло приблизительно 0,8 г/л и 3,2 г/л, соответственно (фиг. 59B).

[0362] Сравнение единичных плазмид TIR1,1 и TIR1,1-совместимых плазмидных систем в отношении экспрессии растворимого FkpA (проанализировано с помощью вестерн-блоттинга) показало, что единичная плазмидная система обеспечивала увеличение количества продуцируемого FkpA (фиг. 60A). Увеличение растворимого FkpA приводило к дополнительному увеличению титра по сравнению с предыдущей совместимой плазмидной системой и достигало конечного титра, равного 65 мг/л (фиг. 60B).

[0363] Подобно совместимой плазмидной системе, описанной для коэкспрессии FkpA, совместимые плазмиды использовались для скрининга различных известных оксидоредуктаз в комбинации с TIR1,1 ImmTAC 1, которые содержали OPC FkpA, описанную ранее (фиг. 61). Коэкспрессия только DsbA и DsbA в сочетании с DsbC приводила к аналогичному снижению титра, равному 20 мг/мл по сравнению с предыдущим условием FkpA. Однако коэкспрессия только DsbC приводила к титру, равному 80 мг/л, что соответствовало увеличению концентрации ImmTAC в 15-20 мг/л (фиг. 62). Увеличение собранного титра в одиночной плазмиде TIR1.1 с коэкспрессией DsbC привело к гипотезе, что увеличение накопления субъединиц, наблюдаемое в предыдущем FkpA одиночном состоянии TIR2,3, может обеспечить дополнительную выгоду для фолдинга и сборки отдельных субъединиц и может привести к дальнейшему увеличению титров. Единичную плазмиду TIR2,3 FkpA тестировали с совместимой системой DsbC (N=4), что обеспечивало средний титр, равный 110 мг/л (фиг. 63).

[0364] Важно отметить, что оптимизация альфа- и бета-субъединиц TIR в сочетании

с коэкспрессией шаперонов FkpA и DsbC и улучшенными условиями процесса, описанными выше (фиг. 55), приводила к 10-кратному увеличению титра ImmTAC 1 (фиг. 64). Шаги оптимизации продуцирования ImmTAC 1 включали коэкспрессию FkpA, изменения процесса (увеличение OUR, более основной pH, сдвиг температуры),
 5 единичную плазмидную систему с FkpA и ImmTAC 1, пропускающую экспрессию DsbC и повышенную прочность TIR.

[0365] Вышеуказанную оптимизацию оценивали с использованием ImmTAC 1. Второй, отличный ImmTAC, ImmTAC 2 тестировали с использованием той же оптимизации. Как показано на фиг. 65A (блот альфа-цепи) и фиг. 65B (блот бета-цепи), тот же самый
 10 ImmTAC TIR и с шапероном обеспечивают наибольшую выгоду с точки зрения собранных ImmTAC 2.

[0366] Совместно эти результаты демонстрируют, что совместная экспрессия FkpA cDsbC и увеличивает продукцию собранных ImmTAC, при использовании нескольких конструктов ImmTAC для подтверждения этих эффектов. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

15 Все полипептидные последовательности представлены с N-конца к C-концу, если не указано иное.

Все полинуклеотидные последовательности представлены с 5'-конца к 3'-концу, если не указано иное.

TIR1 FkpA

20 GAATTATGAA GTCCCTGTTT AAAGTGACGC TGCTGGCGAC CACAATGGCC
 GTTGCCCTGC ATGCACCAAT CACTTTTGCT (SEQ ID NO:1)

TIR2 FkpA

GAATTATGAA GTCGCTATTC AAAGTGACGC TGCTGGCGAC CACAATGGCC
 GTTGCCCTGC ATGCACCAAT CACTTTTGCT (SEQ ID NO:2)

25 TIR3 FkpA (c13)

GAATTATGAA GTCGCTGTTT AAAGTTACGC TGCTGGCGAC CACAATGGCC
 GTTGCCCTGC ATGCACCAAT CACTTTTGCT (SEQ ID NO:3)

Сигнальный пептид FkpA

MKSLFKVTLLATTMAVALHAPITFA

30 (SEQ ID NO:4).

(57) Формула изобретения

1. Способ получения иммуномобилизующего моноклонального Т-клеточного рецептора против рака (ImmTAC), содержащего альфа-цепь Т-клеточного рецептора (TCR) и бета-цепь TCR, в прокариотической клетке-хозяине, причем способ включает:
 35 (а) культивирование клетки-хозяина в культуральной среде в условиях, включающих температуру при фазе роста и скорость перемешивания при фазе роста,

(b) культивирование клетки-хозяина в культуральной среде для экспрессии альфа-цепи TCR и бета-цепи TCR ImmTAC в условиях, включающих температуру при фазе

40 образования продукта и скорость перемешивания при фазе образования продукта, при этом после экспрессии происходит фолдинг и сборка альфа-цепи TCR и бета-цепи TCR с образованием биологически активного ImmTAC в клетке-хозяине;

при этом клетка-хозяин содержит полинуклеотид, содержащий (1) первую единицу трансляции, кодирующую альфа-цепь TCR ImmTAC; (2) вторую единицу трансляции, кодирующую бета-цепь TCR ImmTAC; (3) третью единицу трансляции, кодирующую
 45 пептидил-пролил-изомеразу; где пептидил-пролил-изомераза представляет собой белок FkpA; и

(4) четвертую единицу трансляции, кодирующую протеин-дисульфид-оксидоредуктазу,

где протеин-дисульфид-оксидоредуктаза представляет собой белок DsbC;

где температура при фазе роста находится в диапазоне от около 30°C до около 34°C в течение фазы роста, а температура при фазе образования продукта находится в диапазоне от около 25°C до около 29°C в течение фазы образования продукта, где скорость перемешивания при росте достаточна для достижения клеткой-хозяином в течение фазы роста пиковой скорости поглощения кислорода, которая находится в диапазоне от 3,5 до 4,5 ммоль/л/мин, а скорость перемешивания в течение фазы образования продукта достаточна для достижения клеткой-хозяином в течение фазы образования продукта скорости поглощения кислорода, которая находится в диапазоне от 1,0 до 3,0 ммоль/л/мин; и

(с) выделение биологически активного ImmTAC из клетки-хозяина.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что полинуклеотид дополнительно содержит три копии промотора, причем первая копия функциональным образом объединена с первой единицей трансляции, вторая копия функциональным образом объединена со второй единицей трансляции, а третья копия функциональным образом объединена с третьей единицей трансляции для запуска транскрипции первой цепи, второй цепи и белка FkpA.

3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что промотор представляет собой индуцибельный промотор.

4. Способ по п. 3, отличающийся тем, что индуцибельный промотор представляет собой промотор, индуцируемый IPTG, который запускает транскрипцию альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR и белка FkpA в отсутствие IPTG-индукции.

5. Способ по п. 3, отличающийся тем, что индуцибельный промотор представляет собой Pho-промотор, который запускает транскрипцию альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR и белка FkpA при исчерпании фосфата в культуральной среде.

6. Способ по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что полинуклеотид дополнительно содержит селективный маркер, а культуральная среда содержит селективный агент, состоящий из одиночного антибиотика, вызывающий сохранение полинуклеотида в клетке-хозяине.

7. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что первая единица трансляции содержит первую область инициации трансляции (TIR), которая функциональным образом объединена с кодирующей областью альфа-цепи TCR, а вторая единица трансляции содержит вторую область инициации трансляции (TIR), которая функциональным образом объединена с кодирующей областью бета-цепи TCR, причем относительная интенсивность трансляции первой и второй TIR составляет от около 1,0 до около 3,0.

8. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что белок FkpA представляет собой белок FkpA *E. coli*.

9. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что белок DsbC представляет собой DsbC *E. coli*.

10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что прокариотическая клетка-хозяин представляет собой грамотрицательную бактерию.

11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что грамотрицательная бактерия представляет собой *E. coli*.

12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что *E. coli* принадлежит к штамму с мутацией *degPS210A*.

13. Способ по п. 11, отличающийся тем, что *E. coli* представляет собой штамм с генотипом W3110 $\Delta fhuA \Delta phoA ilvG2096 (Val^I) \Delta prc spr43H1 \Delta degP \Delta manA lacI^R \Delta ompT$

ΔmenE degpS210A.

14. Способ по любому из пп. 1-13, отличающийся тем, что альфа-цепь TCR содержит
вариабельный домен альфа-цепи TCR и константный домен альфа-цепи TCR, при этом
бета-цепь TCR содержит вариабельный домен бета-цепи TCR и константный домен
бета-цепи TCR.

15. Способ по любому из пп. 1-14, отличающийся тем, что две цепи ImmTAC связаны
друг с другом по меньшей мере одной дисульфидной связью.

16. Способ по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что ImmTAC дополнительно
содержит фрагмент антитела, который связывает Т-клетку и активирует Т-клеточный
ответ.

17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что фрагмент антитела содержит фрагмент
одноцепочечного антитела против CD3.

18. Способ по любому из пп. 1-17, отличающийся тем, что ImmTAC содержит TCR,
который модифицирован так, чтобы обладать повышенным сродством к антигену, по
сравнению со сродством к антигену TCR, который не был модифицирован.

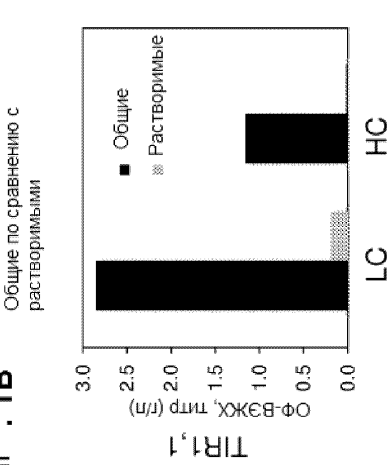
19. Способ по любому из пп. 1-18, отличающийся тем, что ImmTAC выделяют из
периплазмы клетки-хозяина.

20. Способ по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что скорость перемешивания
при фазе роста превышает скорость перемешивания при фазе образования продукта
на 10-40%.

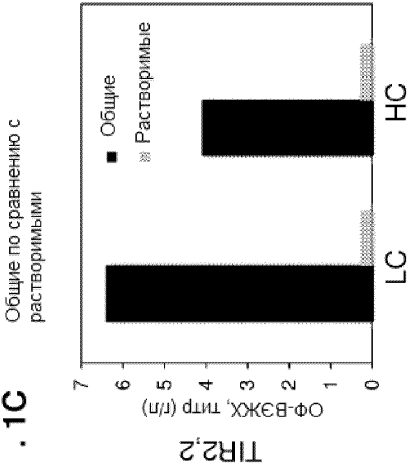
1

1/66

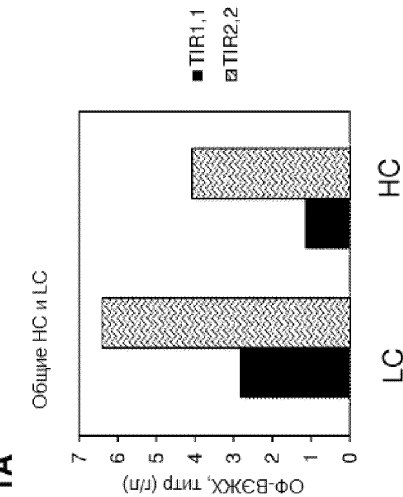
ФИГ . 1В



ФИГ . 1С

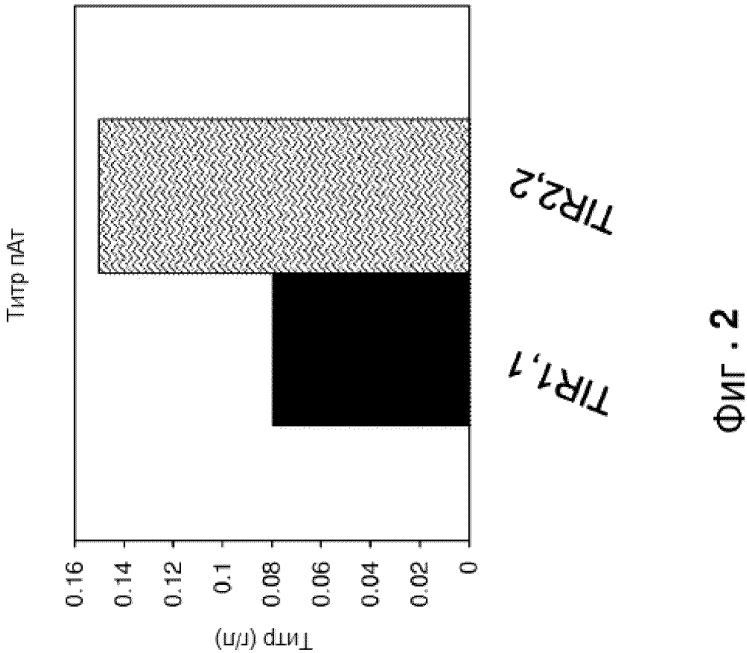


ФИГ . 1А

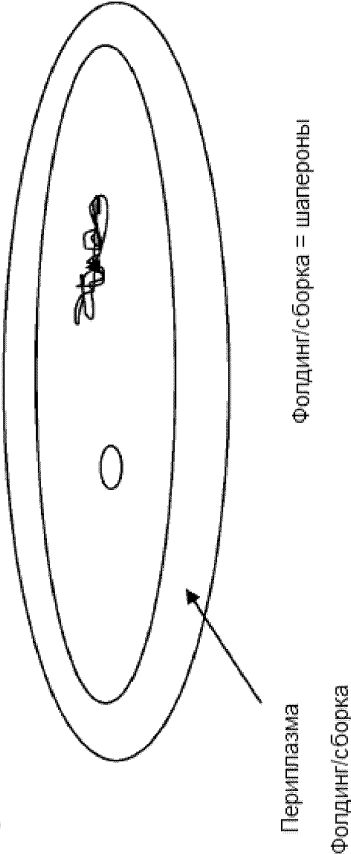


2

2/66



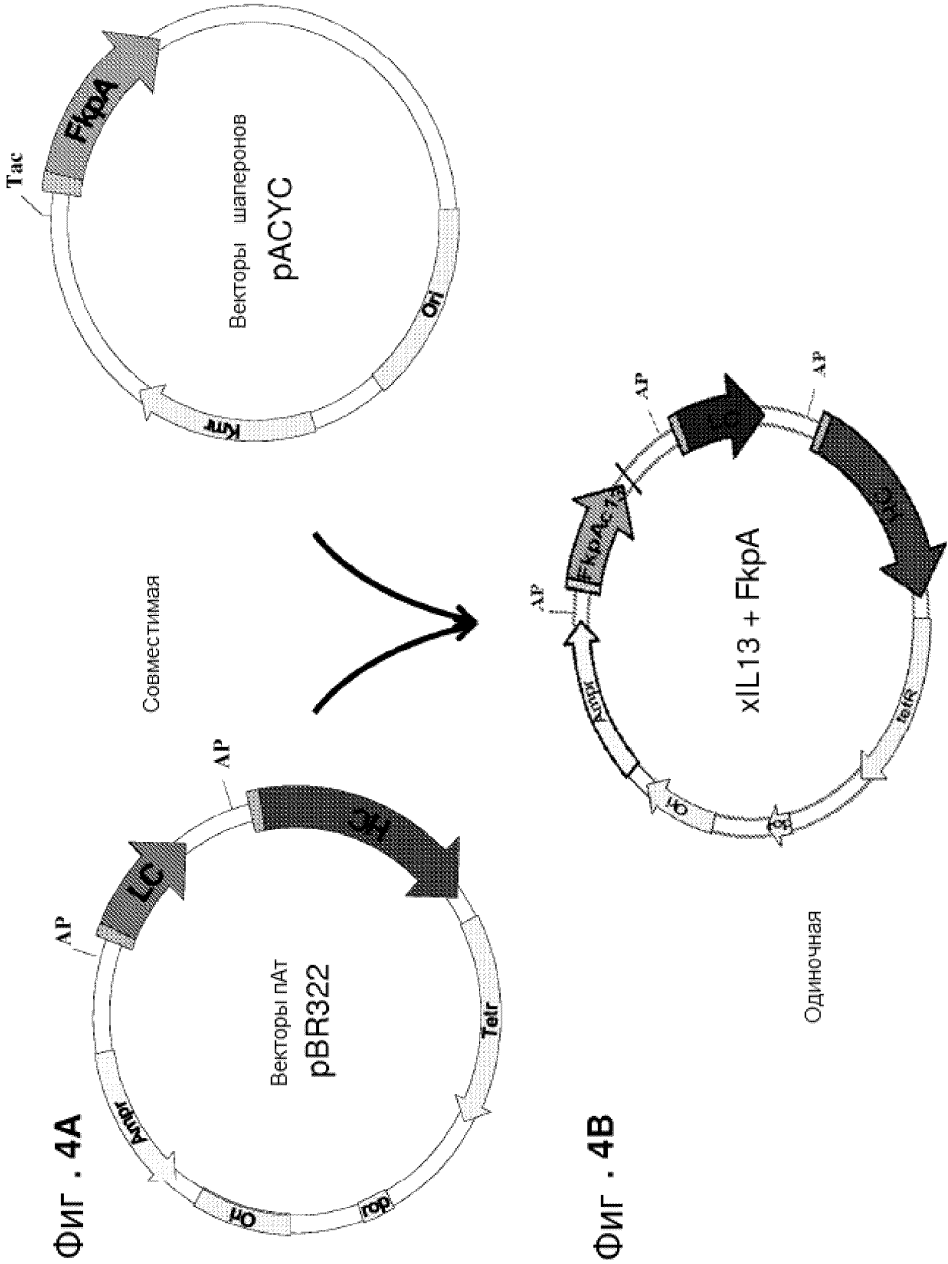
ФИГ . 3А



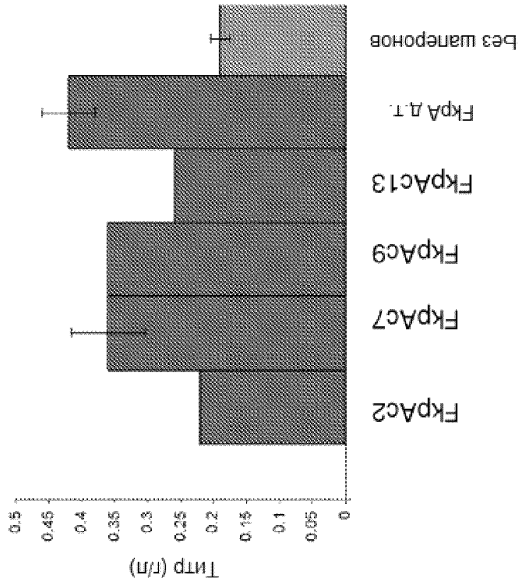
ФИГ . 3В

Рiазы:	Оксидоредуктазы:	Шапероны:
RotA	DsbA	Skp
SurA	DsbC	Spy
FkpA	DsbG	FkpA
		SurA

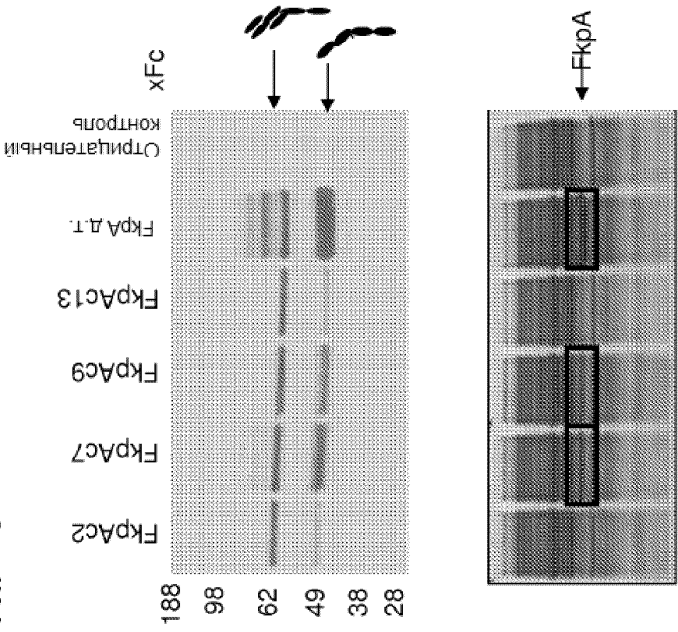
4/66



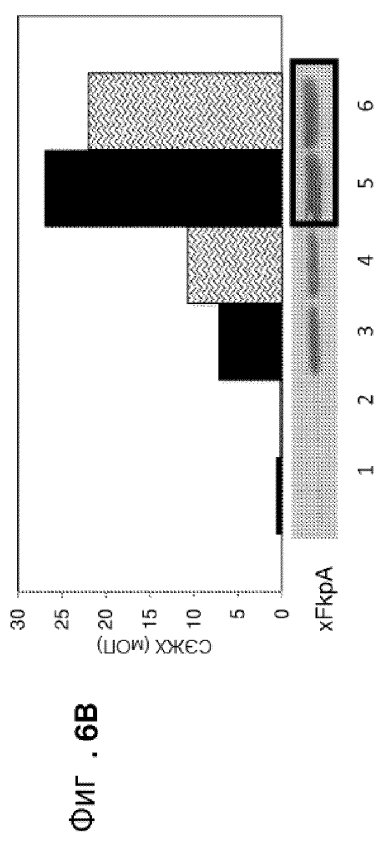
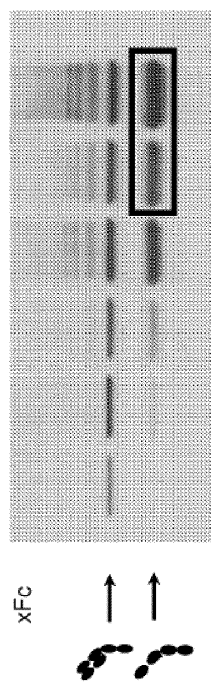
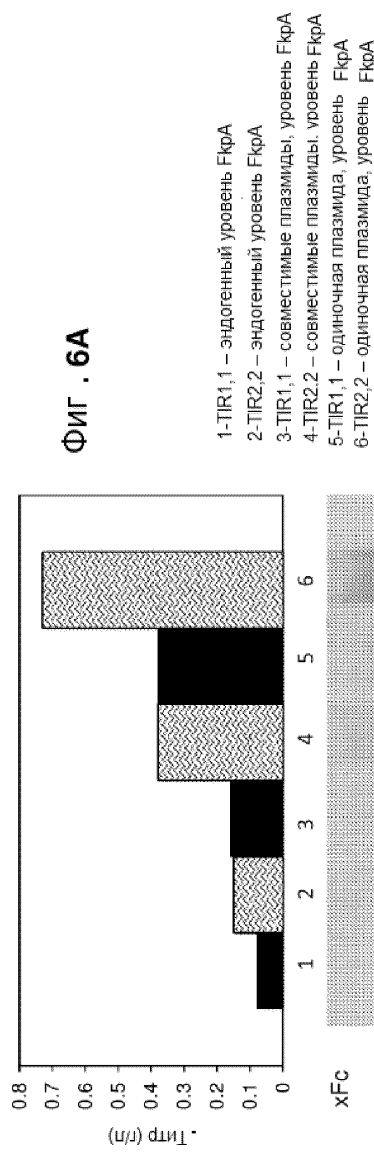
Фиг . 5B



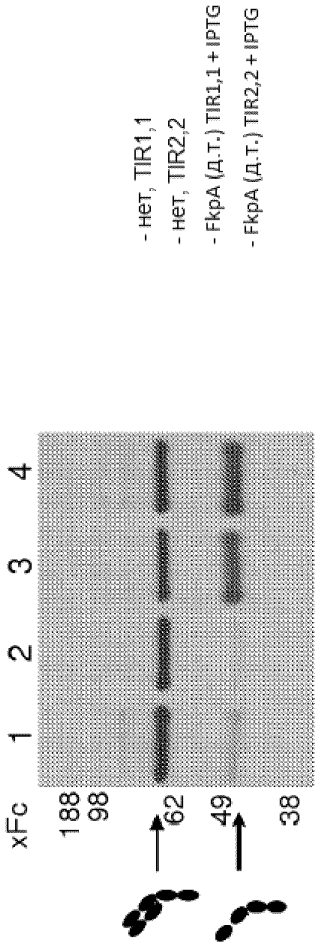
Фиг . 5A



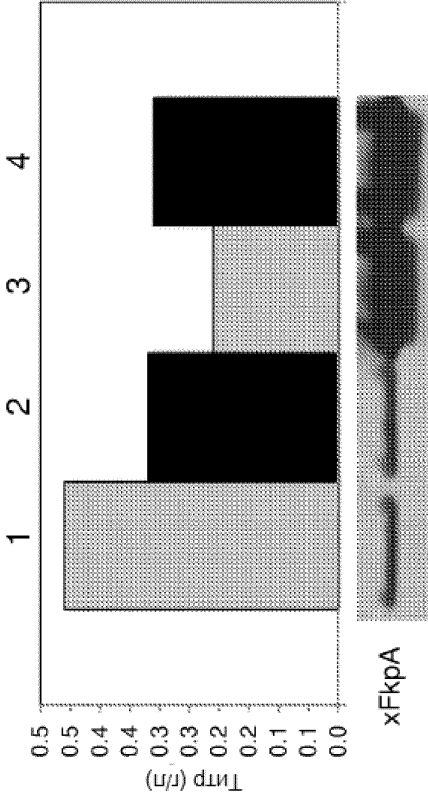
FkpA (д.т.) > FkpAc7 > FkpAc9 > FkpAc2 > FkpAc13



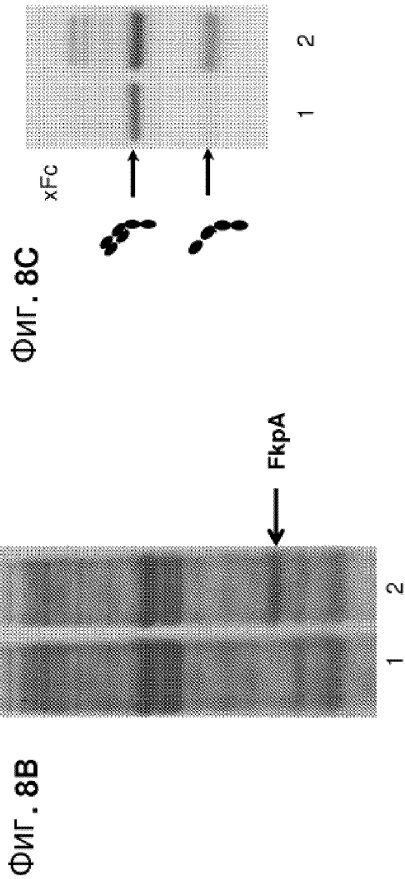
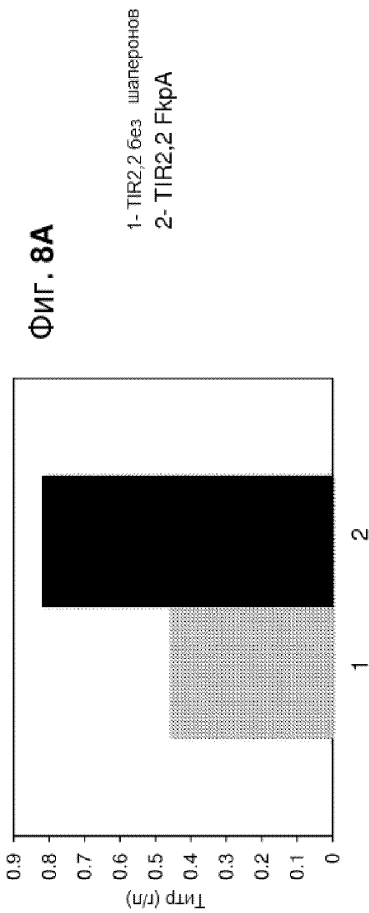
Фиг. 7А



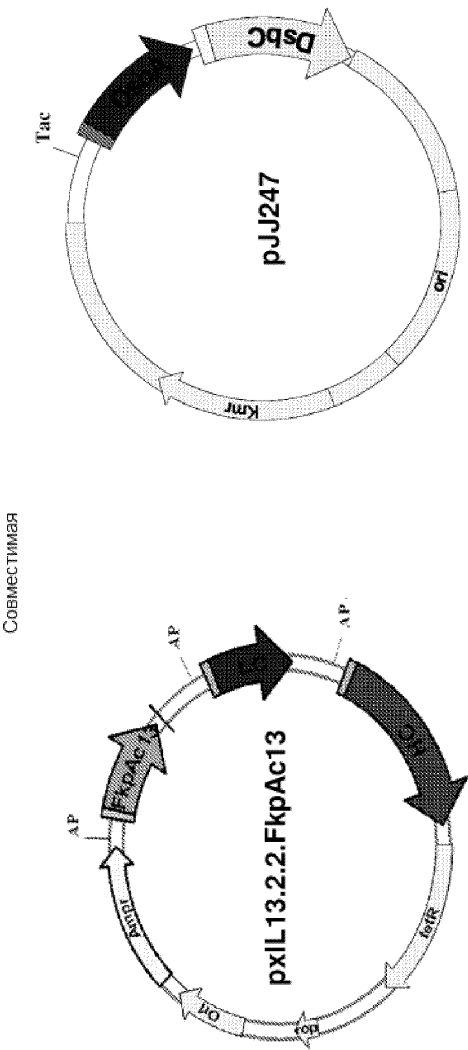
Фиг. 7В



8/66

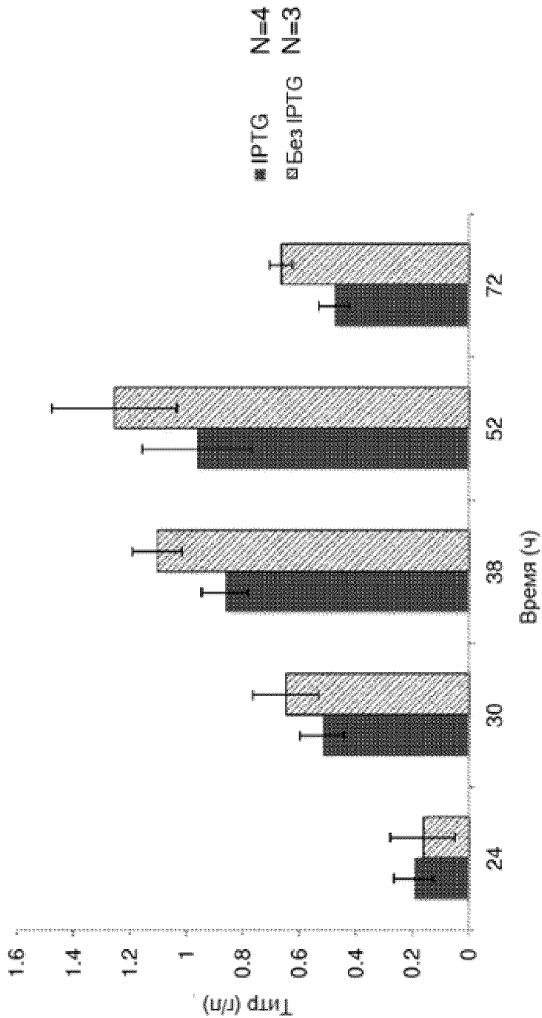


9/66



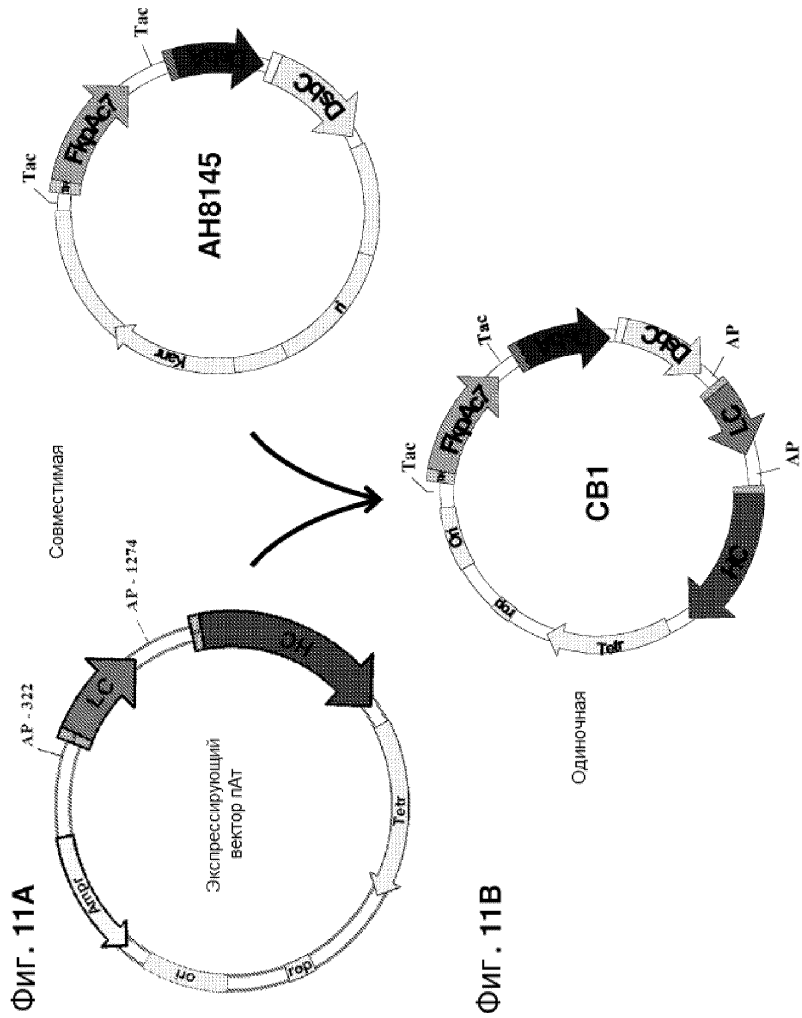
Фиг. 9

10/66

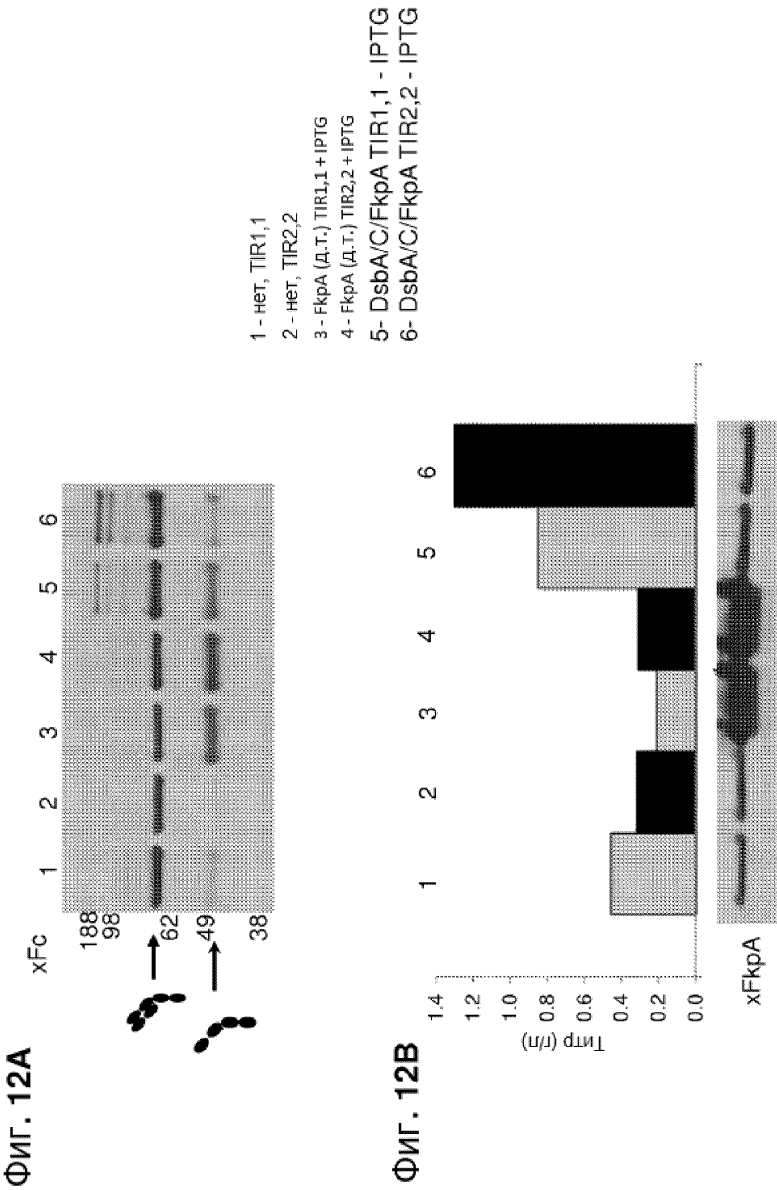


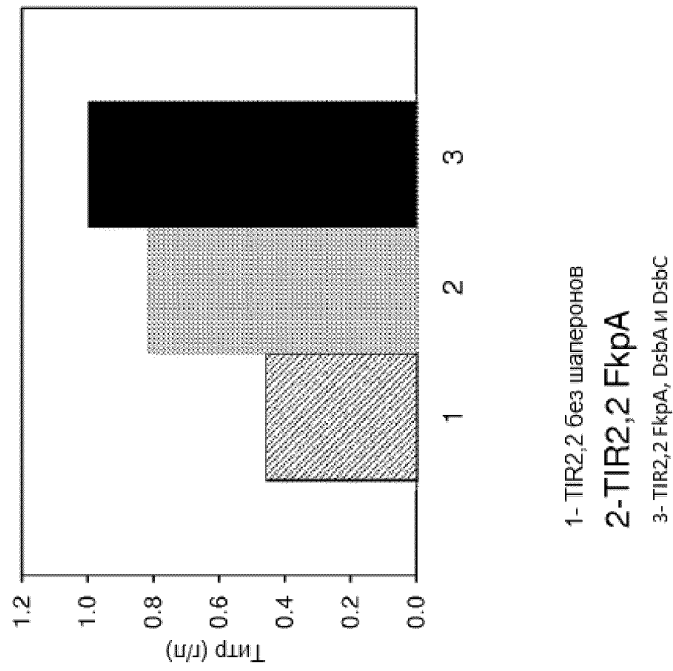
Фиг. 10

11/66



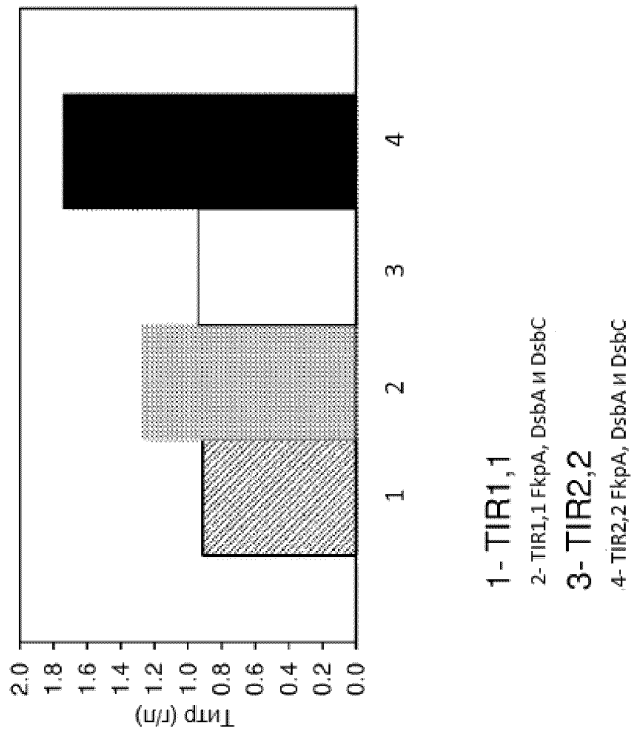
12/66





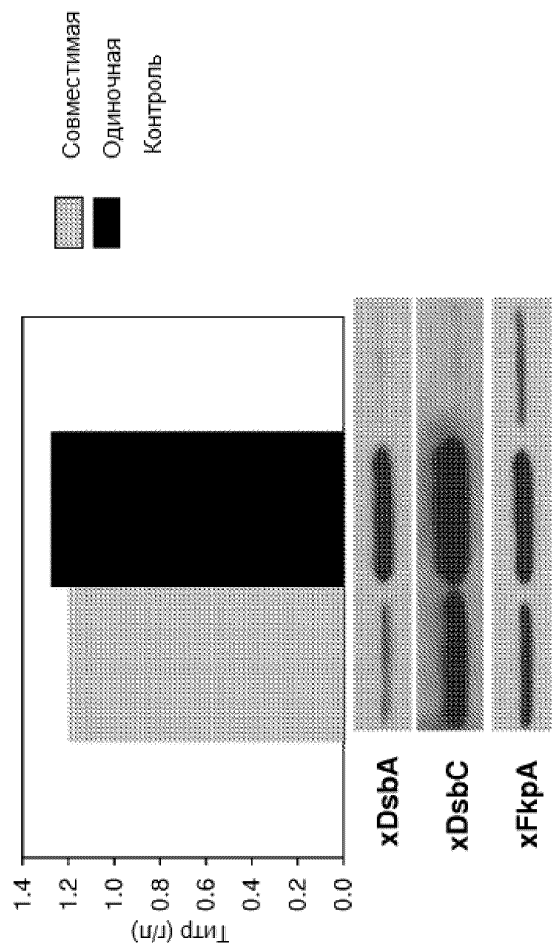
Фиг. 13

14/66



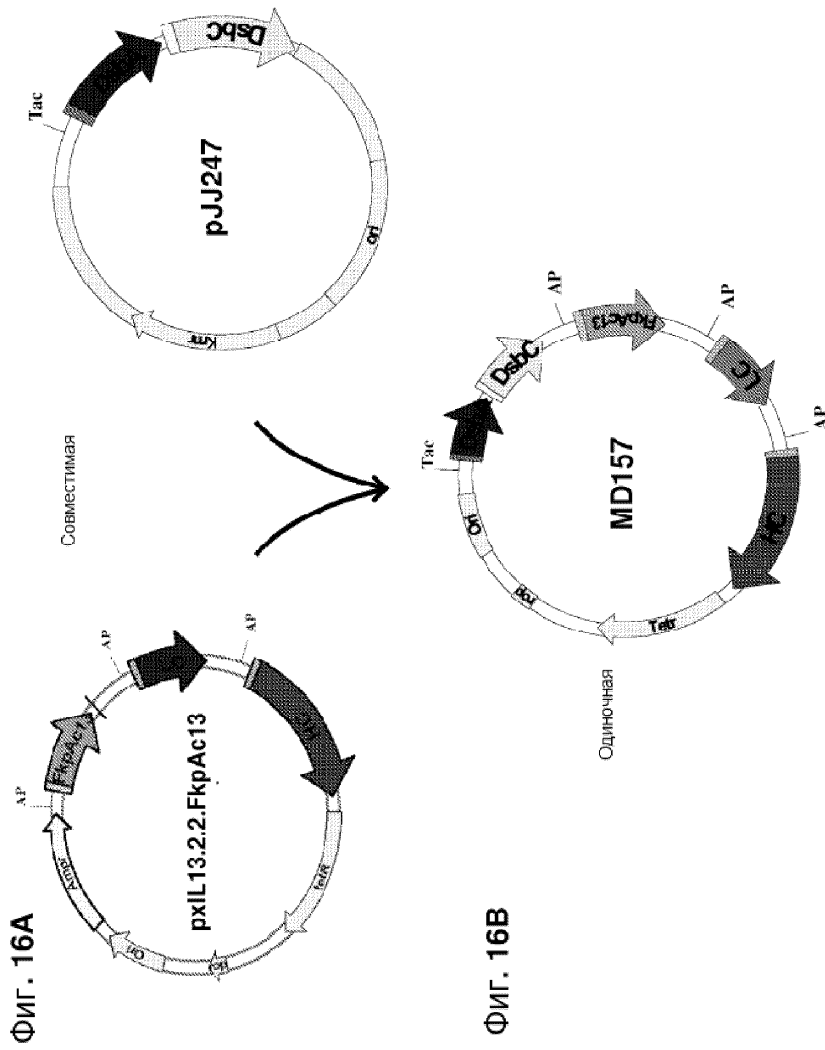
Фиг. 14

15/66

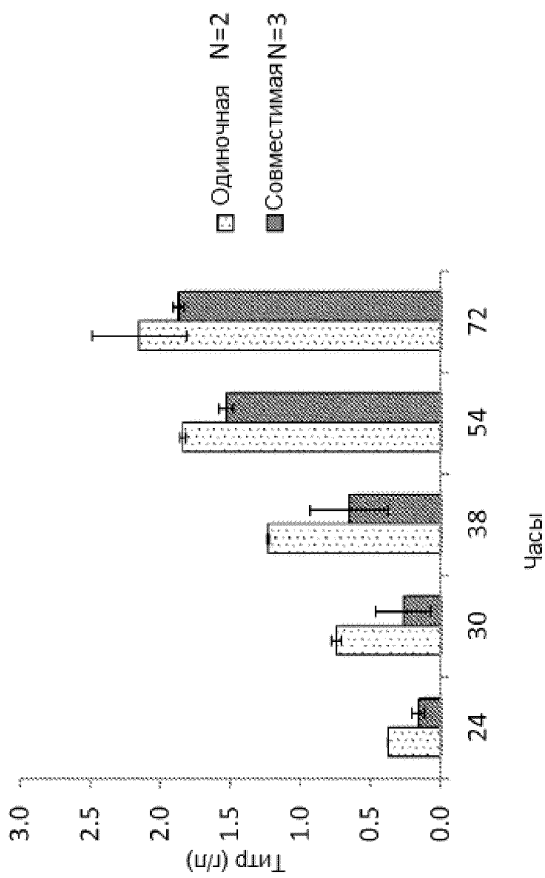


Фиг. 15

16/66

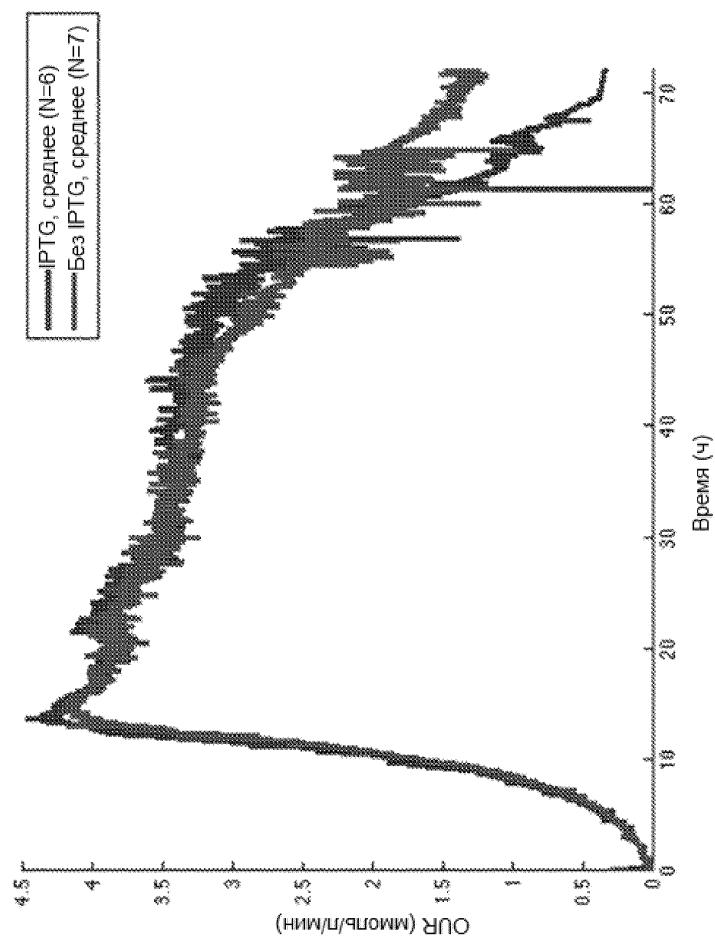


17/66



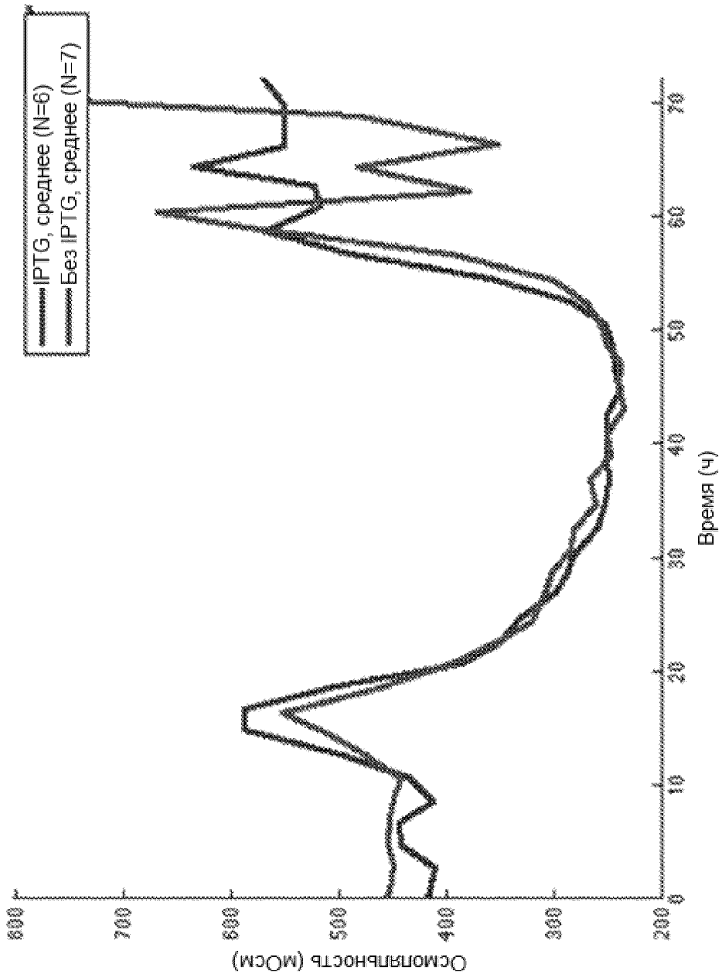
Фиг. 17

18/66



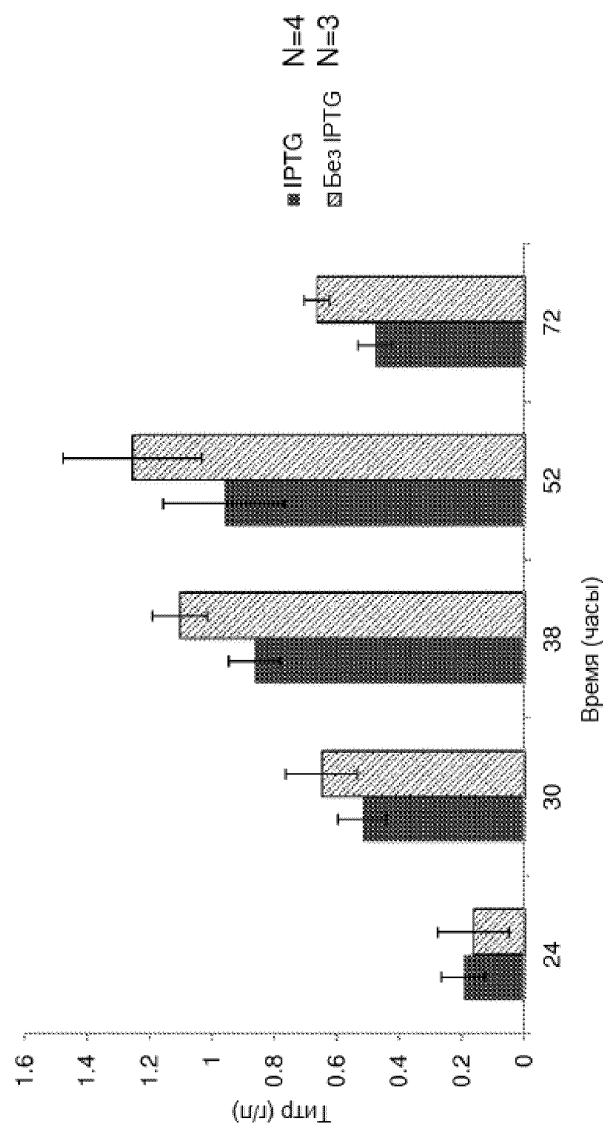
ФИГ. 18

19/66



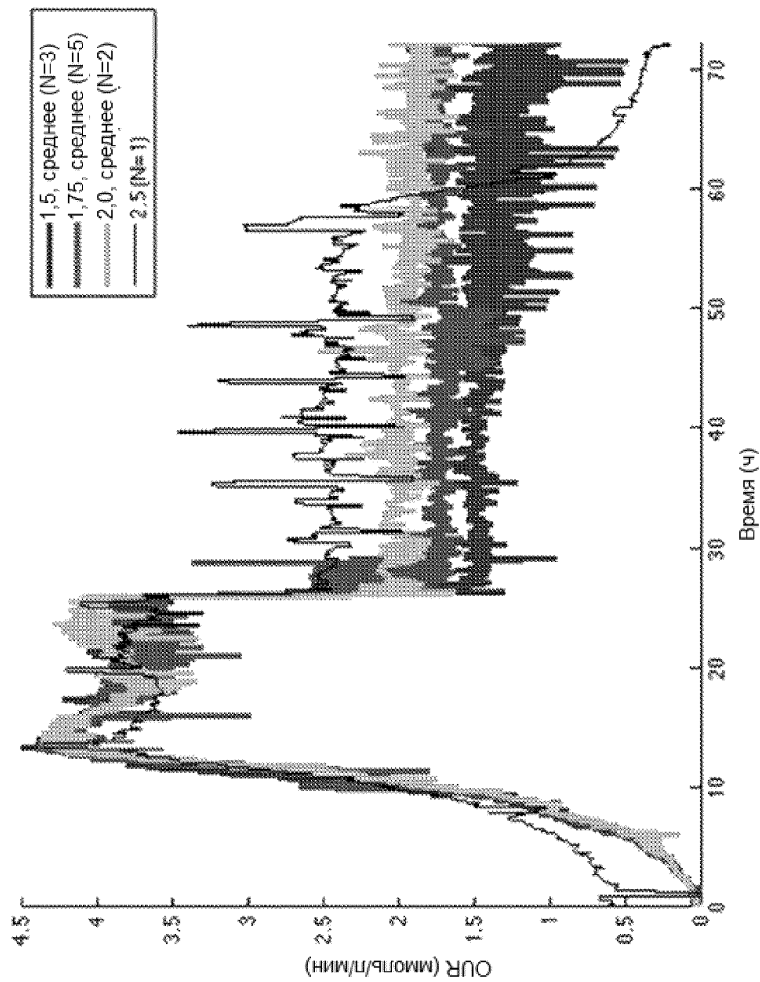
Фиг. 19

20/66



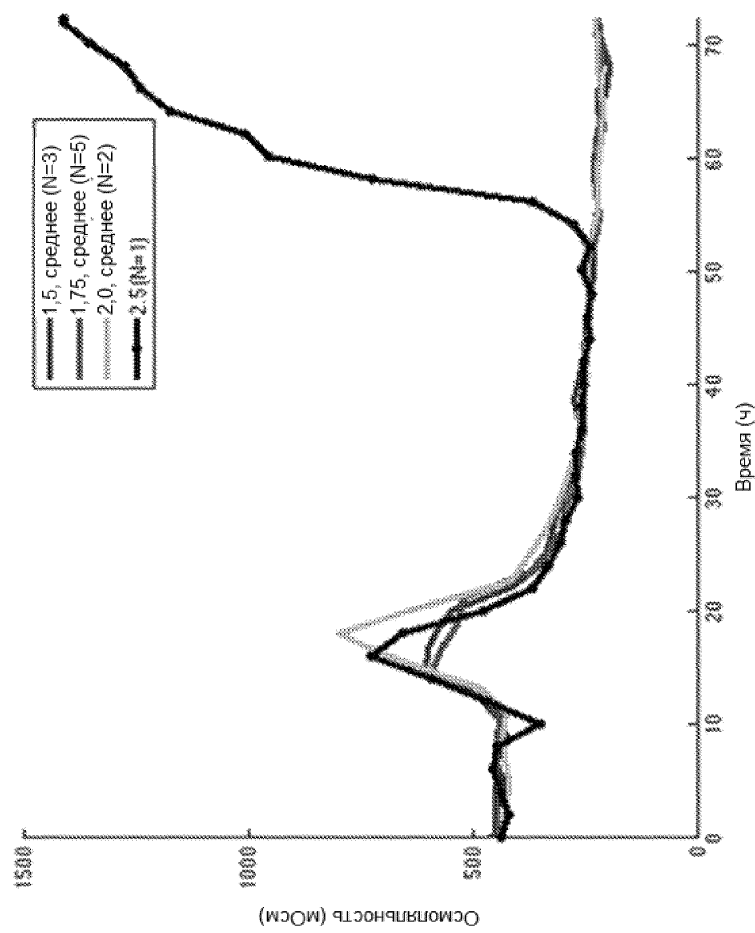
ФИГ. 20

21/66

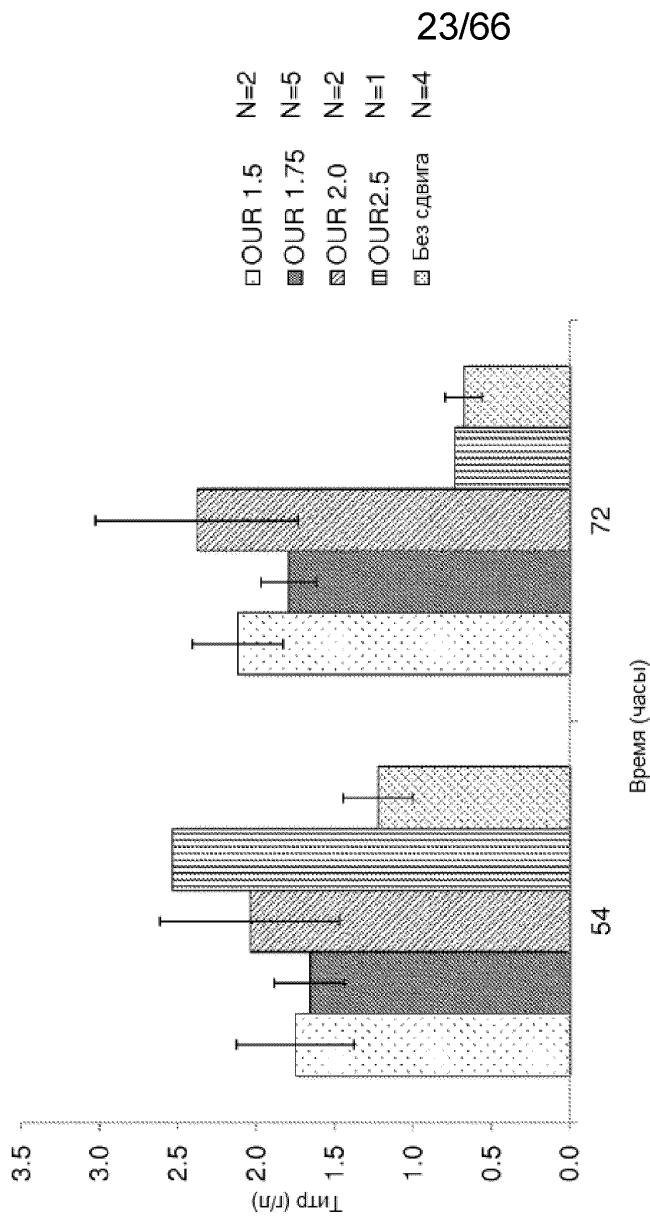


Фиг. 21

22/66

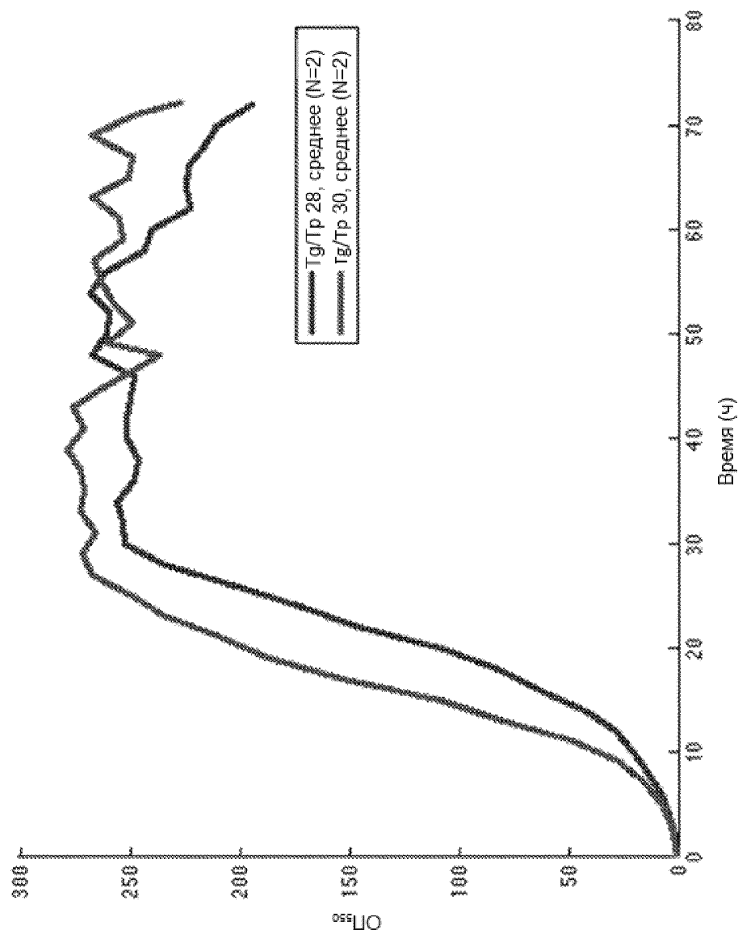


ФИГ. 22



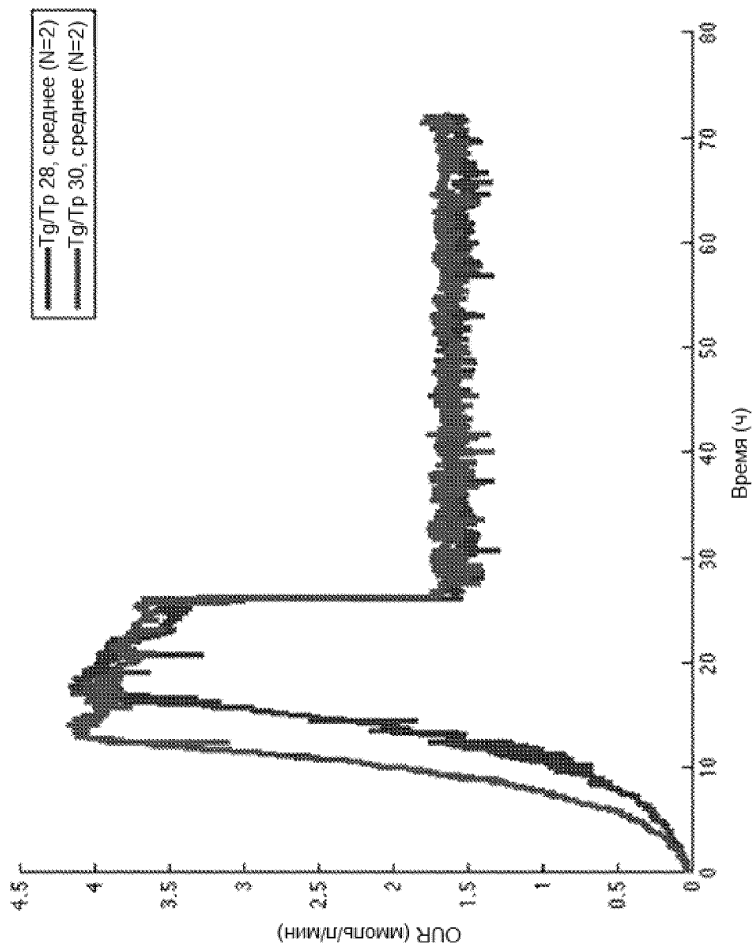
ФИГ. 23

24/66



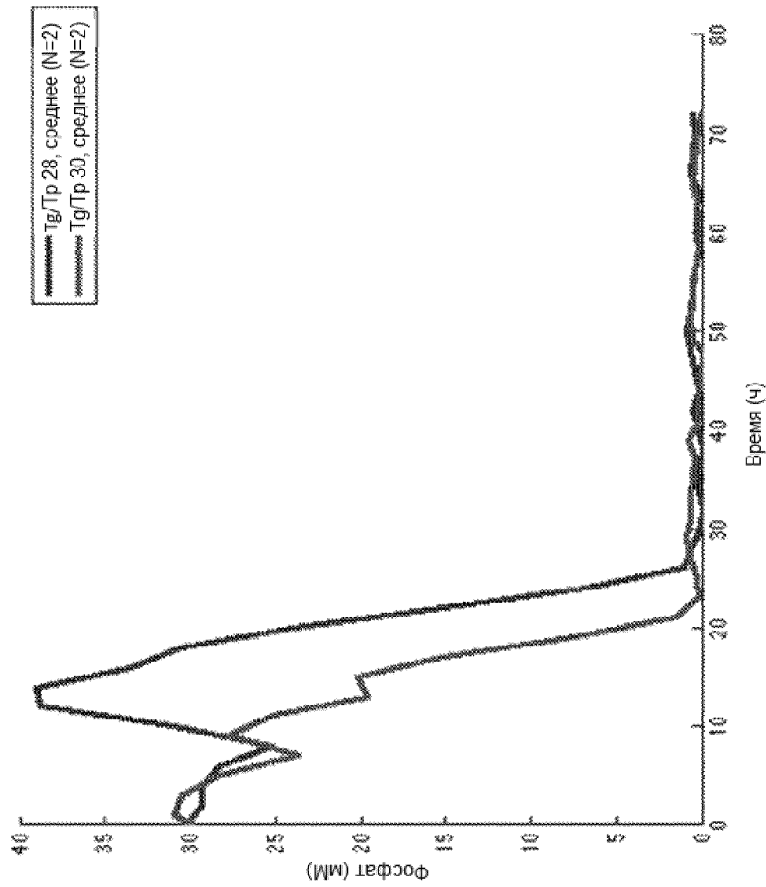
ФИГ. 24

25/66

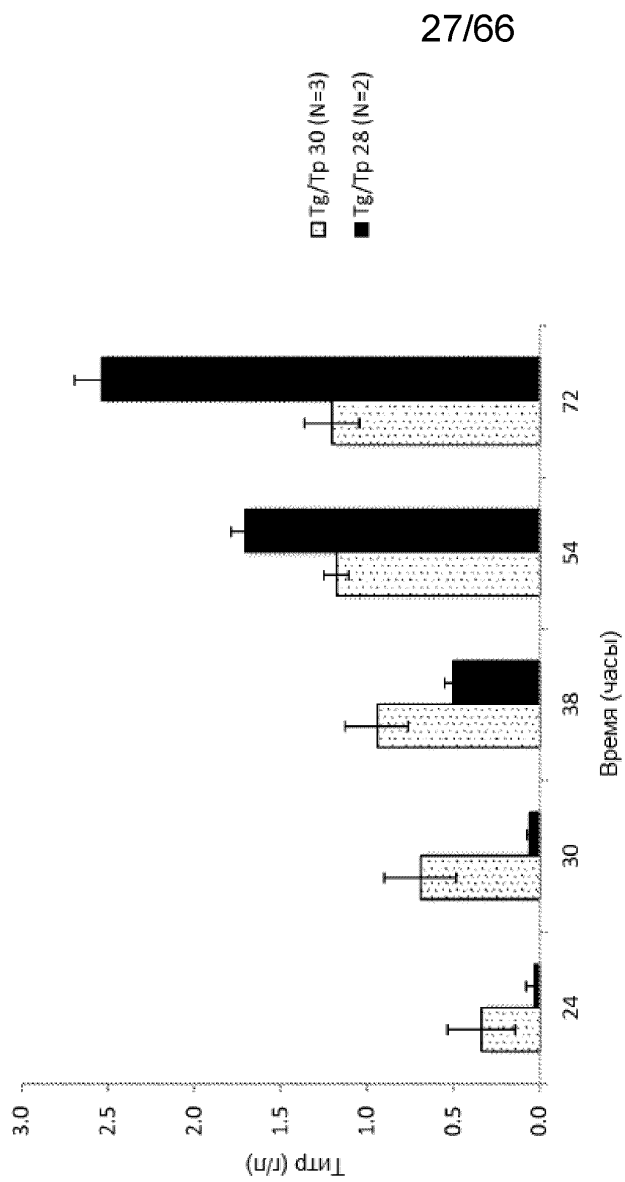


ФИГ. 25

26/66

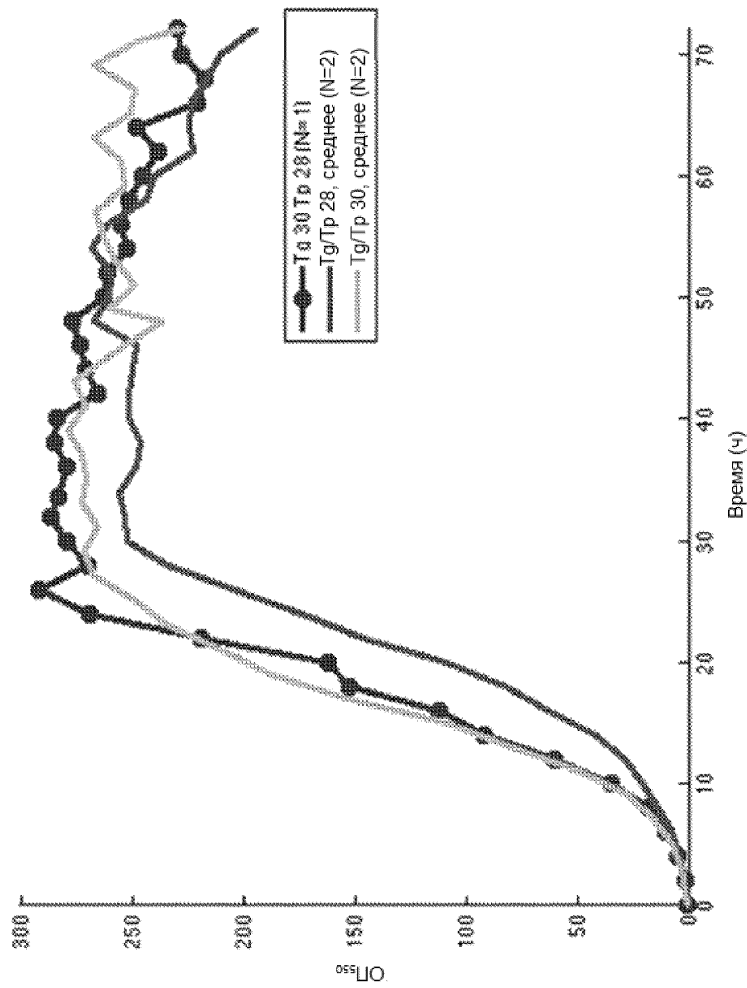


Фиг. 26



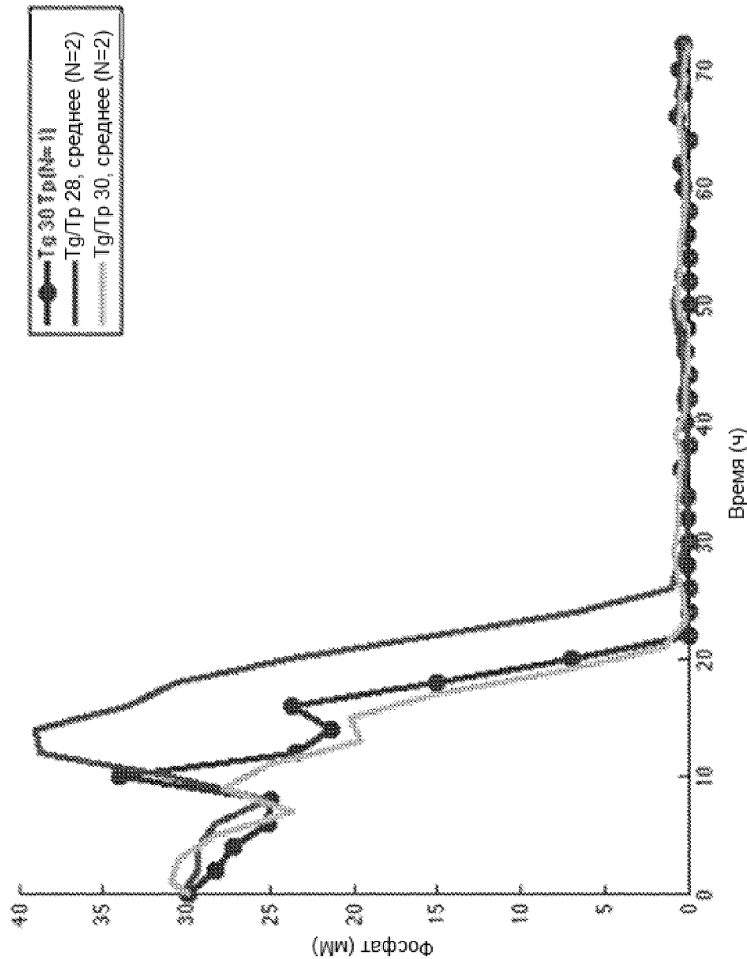
ФИГ. 27

28/66



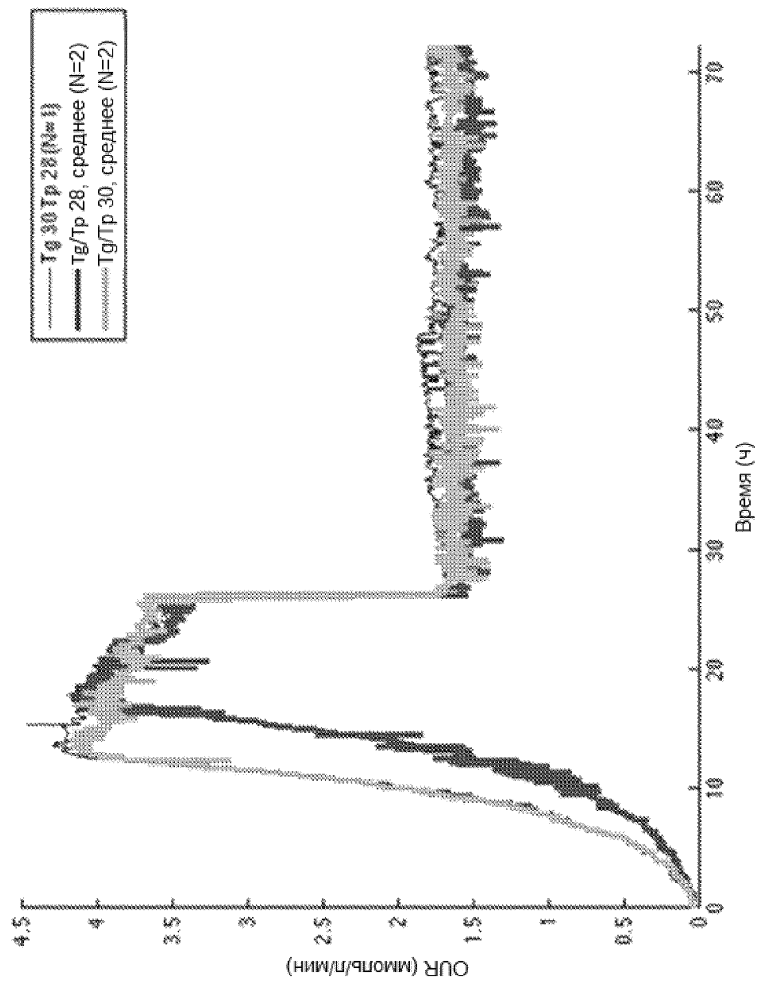
ФИГ. 28

29/66



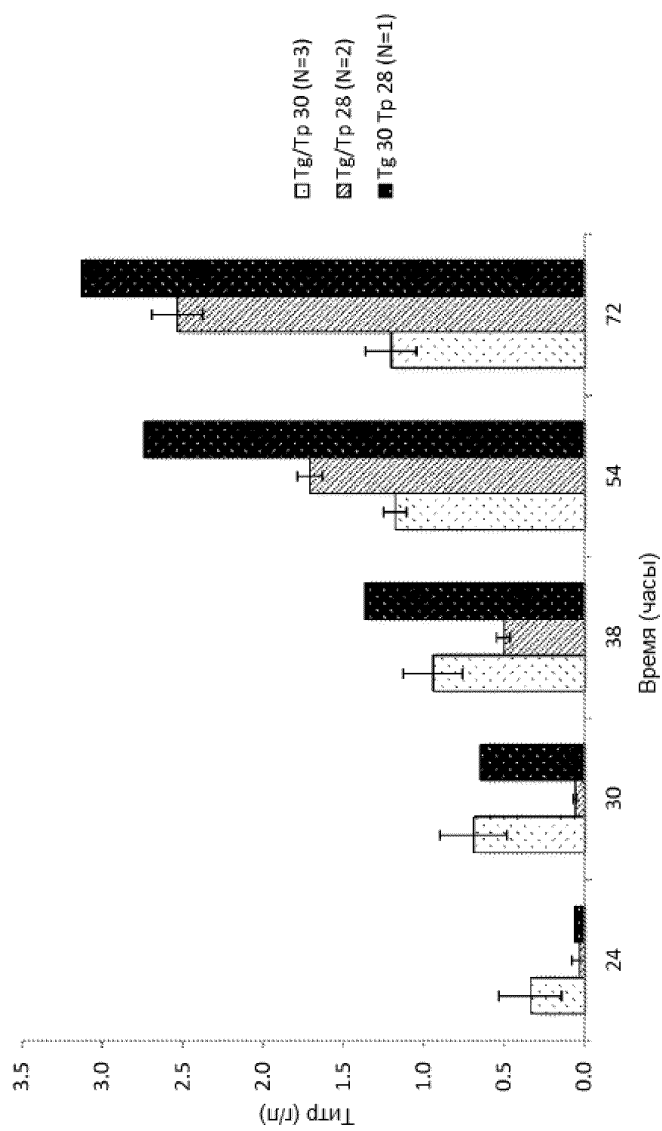
Фиг. 29

30/66



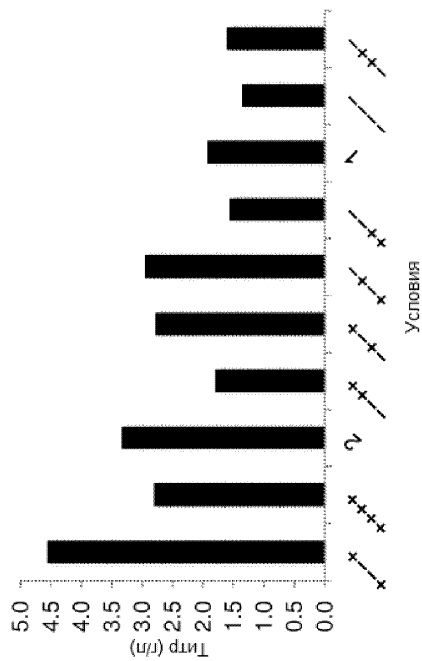
ФИГ. 30

31/66



ФИГ. 31

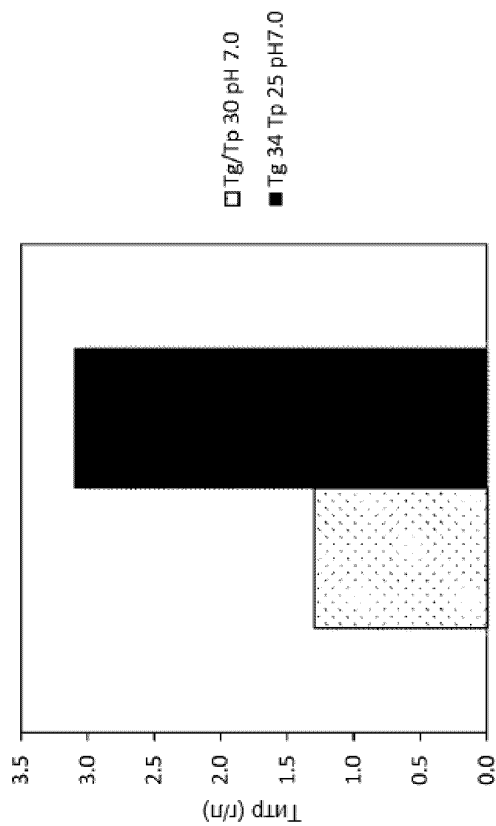
32/66



Картина	Tg	Тр	pH	ФкpA
---+	30	28	6.7	pho
0001	32	26.5	6.85	pho
----	30	25	6.7	tac
+--+	34	25	7	tac
++++	34	25	6.7	pho
----	30	25	7	pho
+++	30	28	7	tac
++++	34	28	7	pho
++--	34	28	6.7	tac
0002	32	26.5	6.85	pho

Фиг. 32

33/66



Фиг. 33

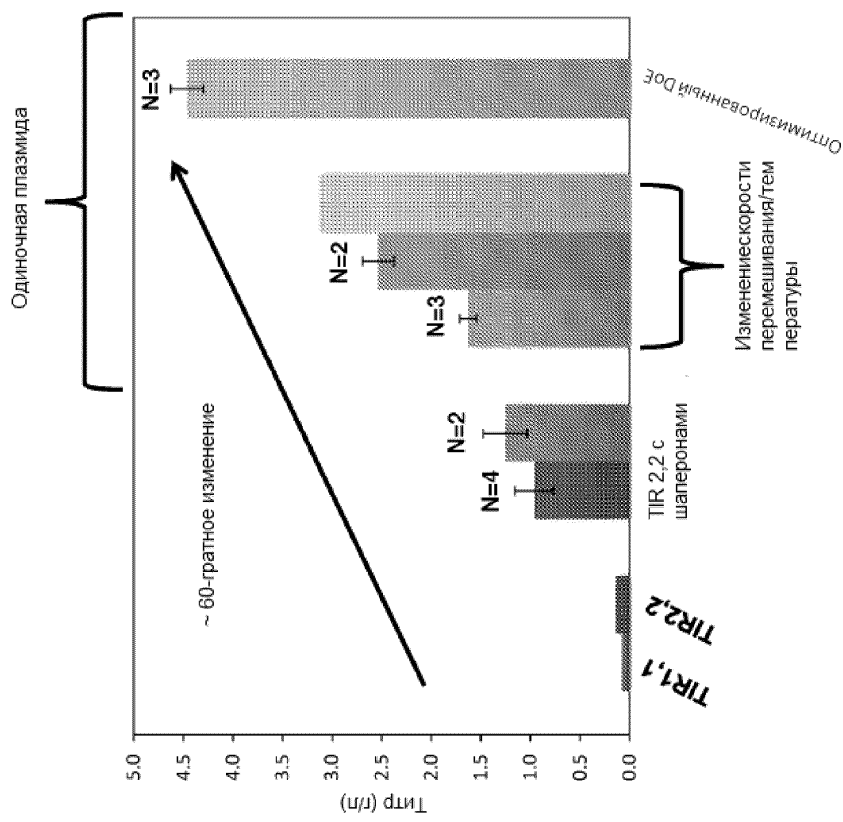
34/66



Картина	Tg	Tr	pH
+-	30	30	6.7
000	32	27.5	7.0
---	30	25	6.7
--+	30	25	7.3
+-+	34	25	7.3
000	32	27.5	7.0
++-	34	30	6.7
+--	34	25	6.7
-++	30	30	7.3
+++	34	30	7.3

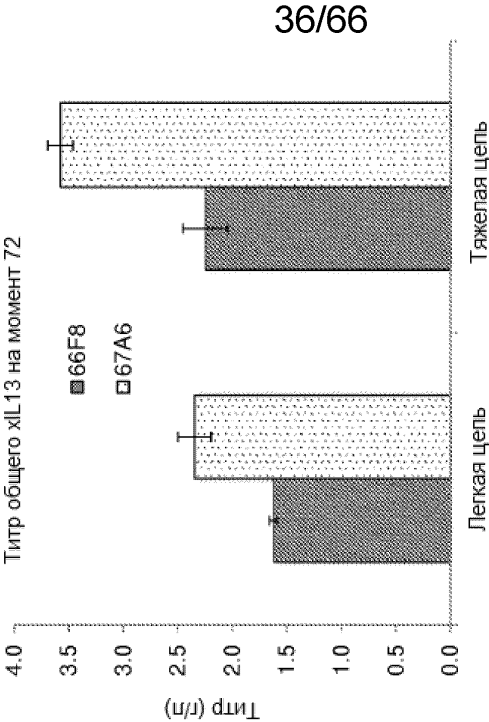
Фиг. 34

35/66

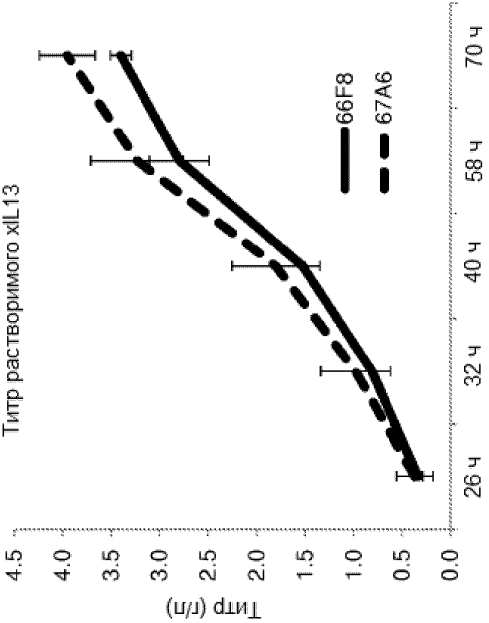


Фиг. 35

ФИГ. 36В



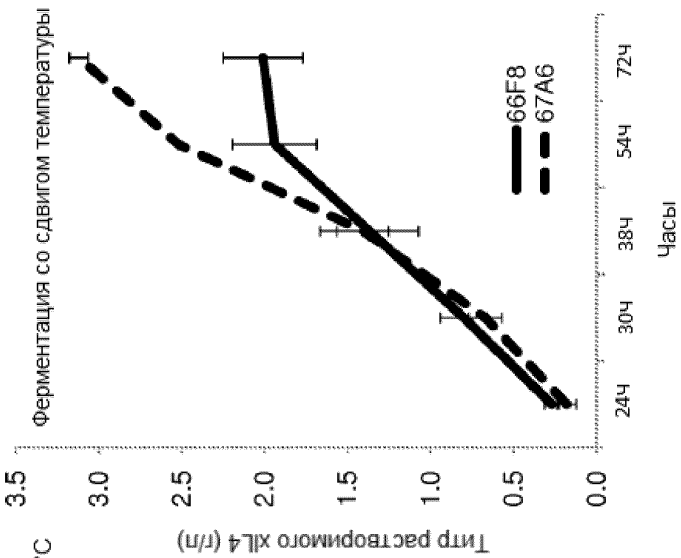
ФИГ. 36А



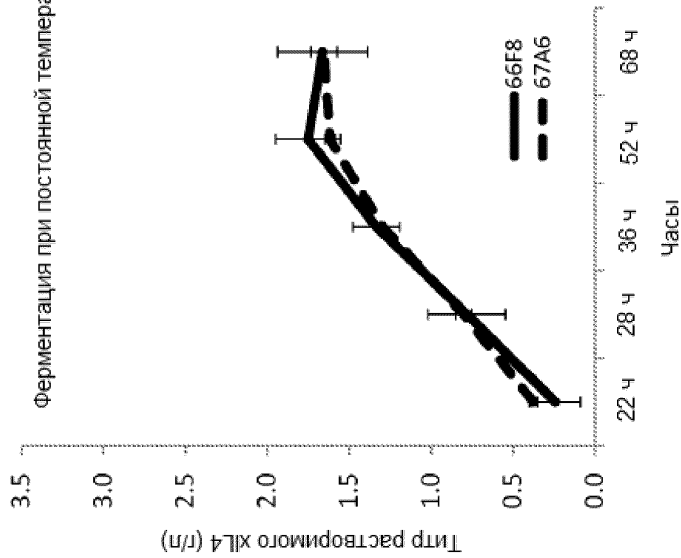
66F8 = ΔDegP
67A6 = +DegPS210A

37/66

ФИГ. 37В

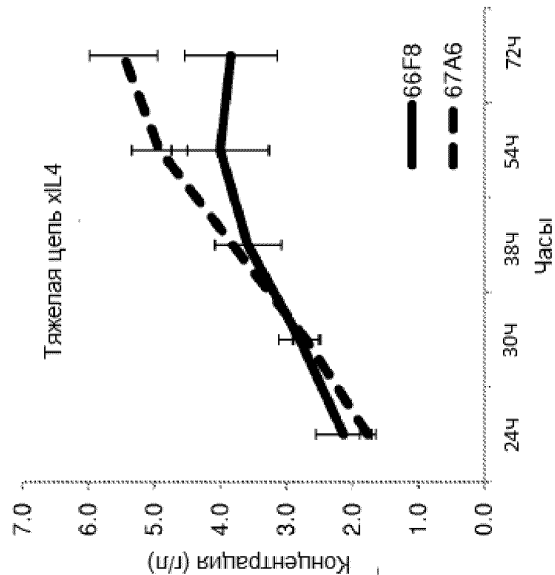


ФИГ. 37А

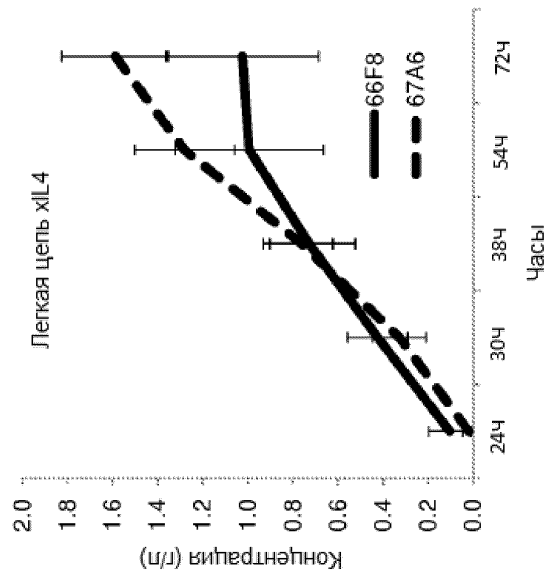


38/66

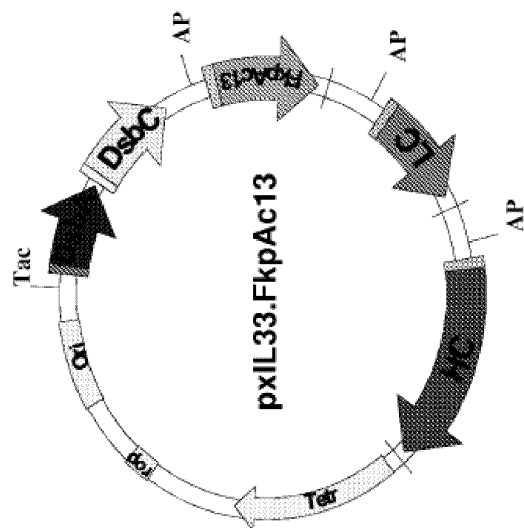
Фиг. 38В



Фиг. 38А



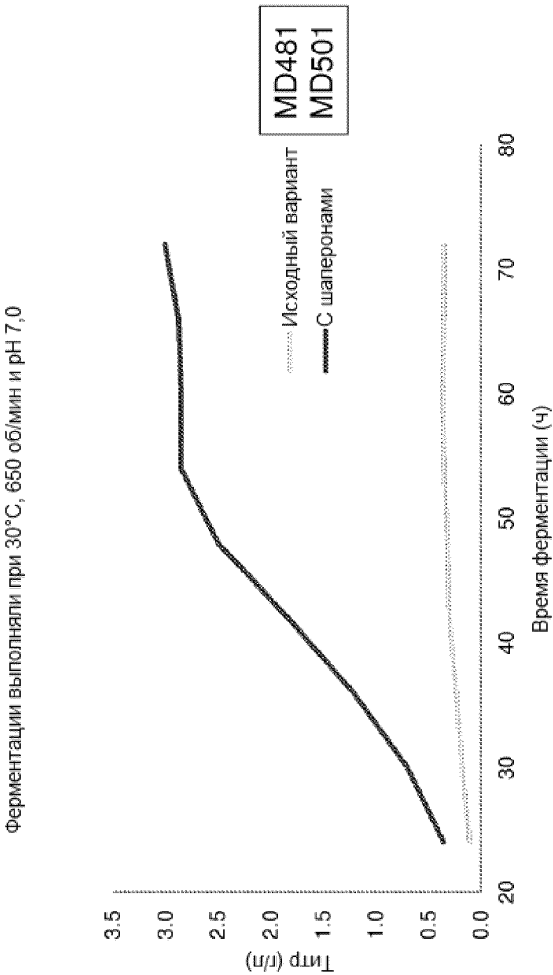
39/66



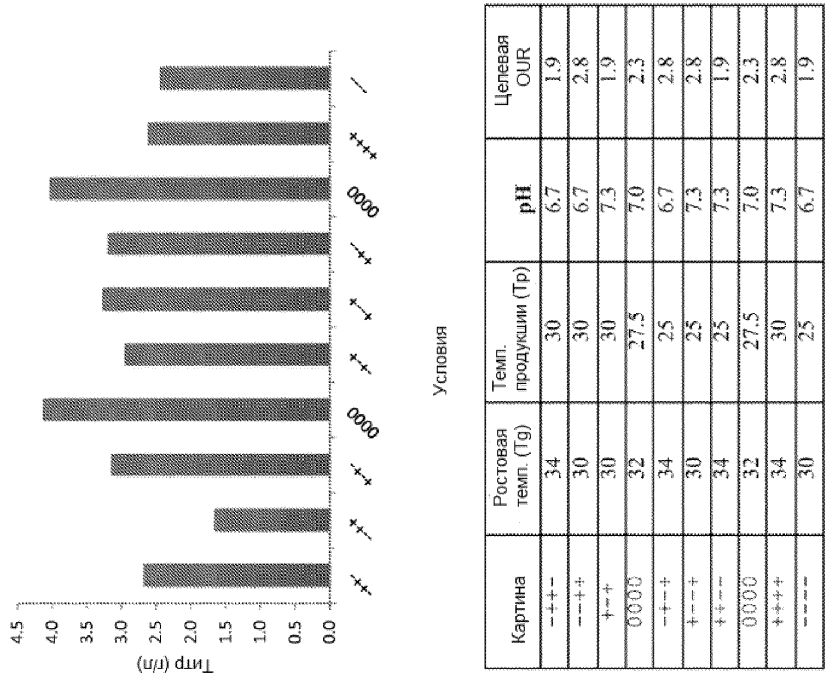
Одиночная плаزمида

Фиг. 39

40/66

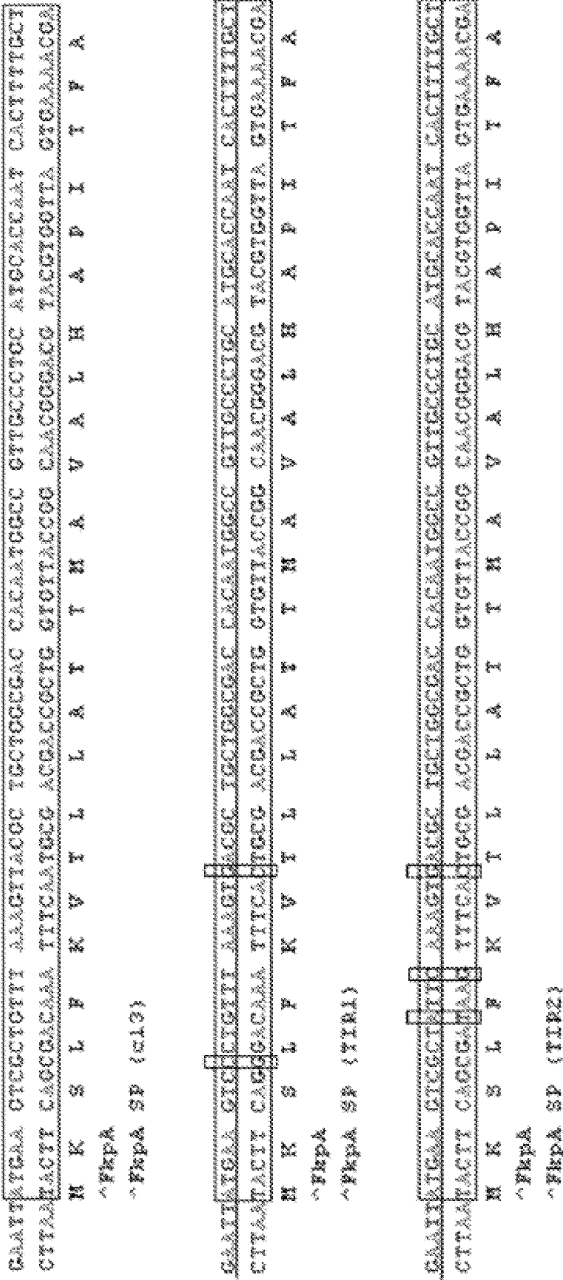


ФИГ. 40



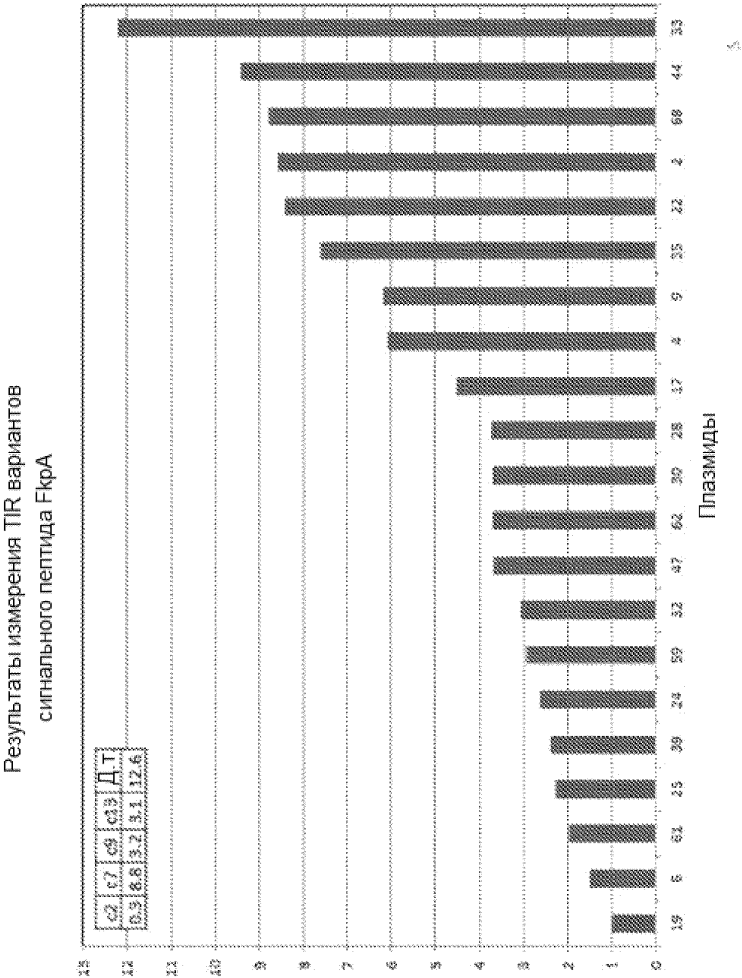
Фиг. 41

Последовательность вариантов сигнального пептида Fkpa



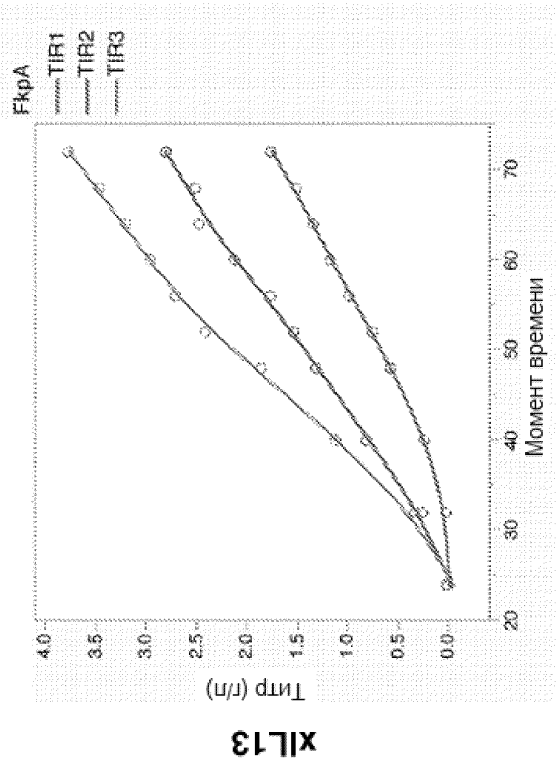
ФИГ. 42

43/66



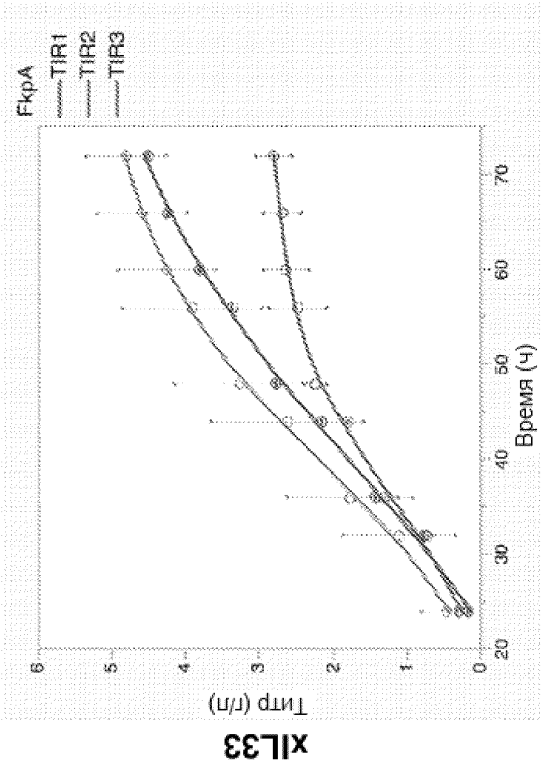
ФИГ . 43

44/66



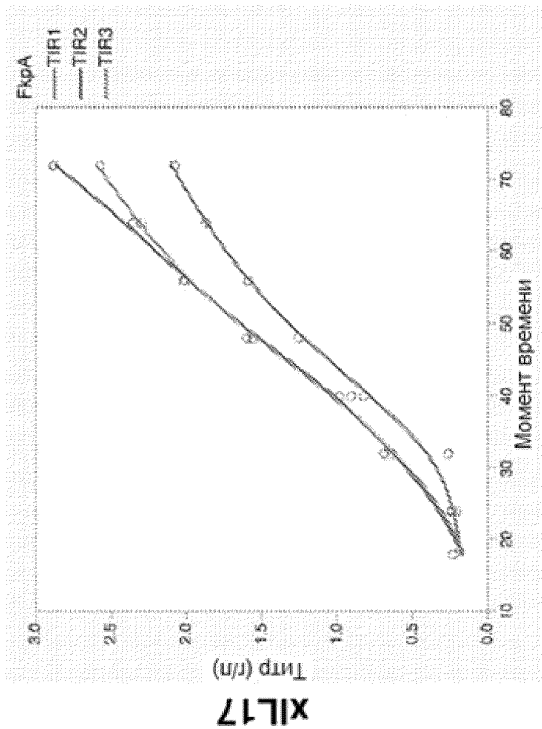
ФИГ. 44

45/66



ФИГ . 45

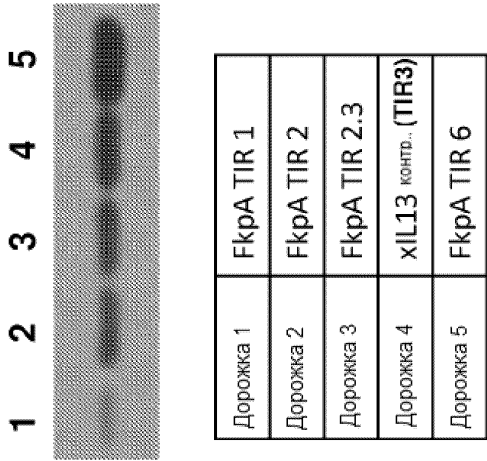
46/66



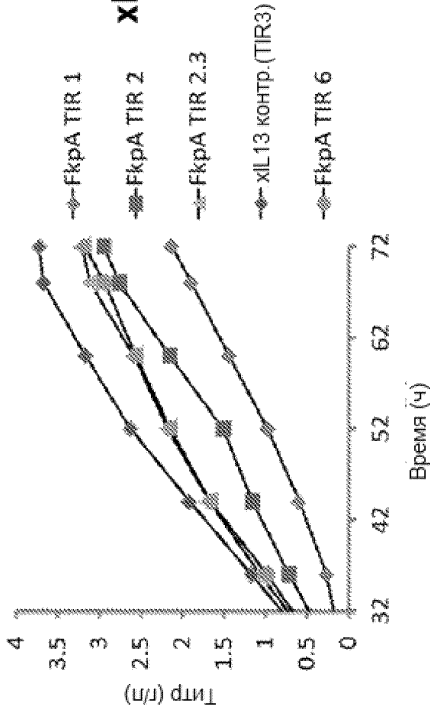
ФИГ . 46

47/66

ФИГ. 47В

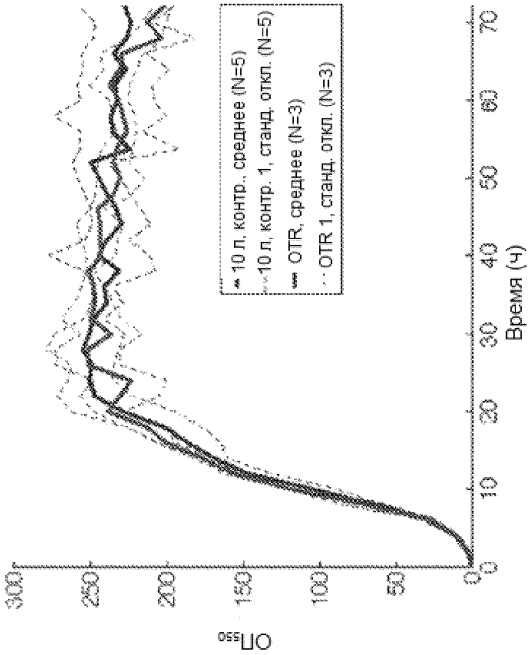


ФИГ. 47А

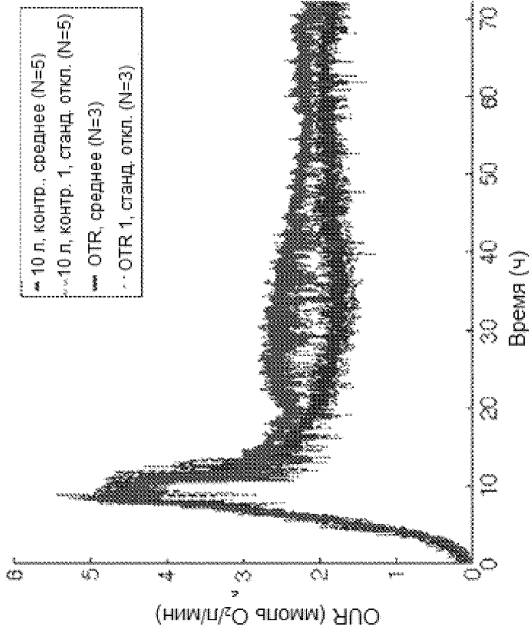


48/66

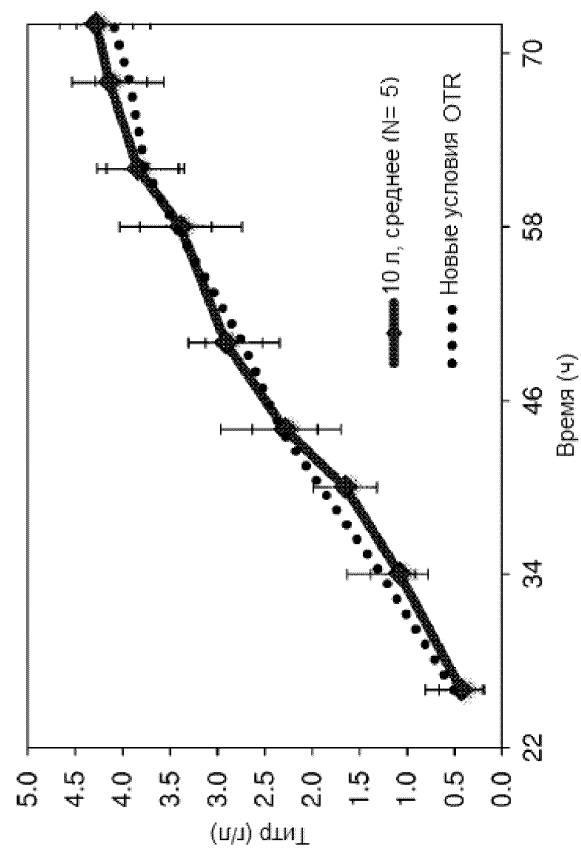
ФИГ . 48В



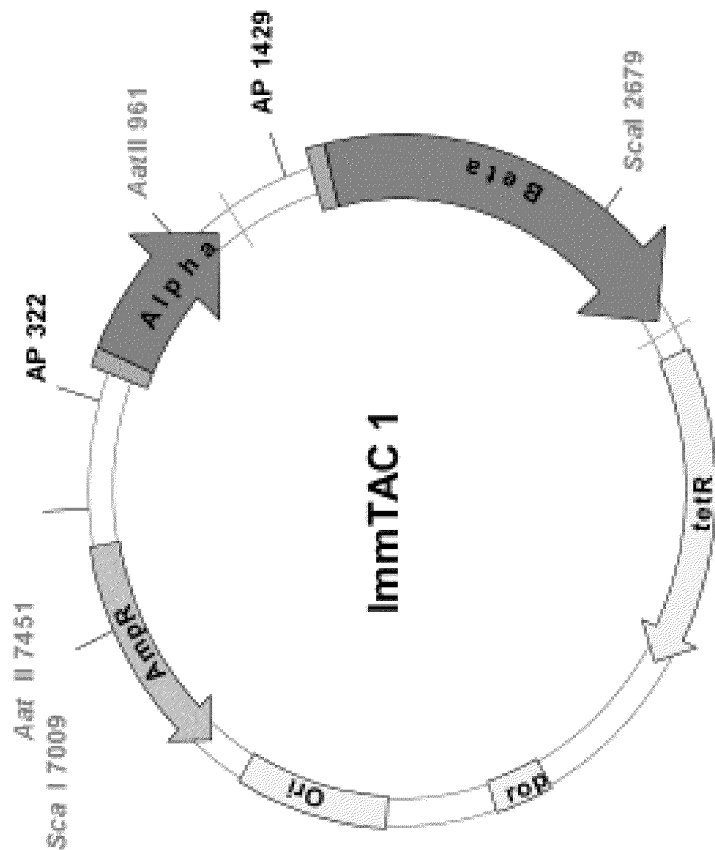
ФИГ . 48А



49/66



Фиг . 49



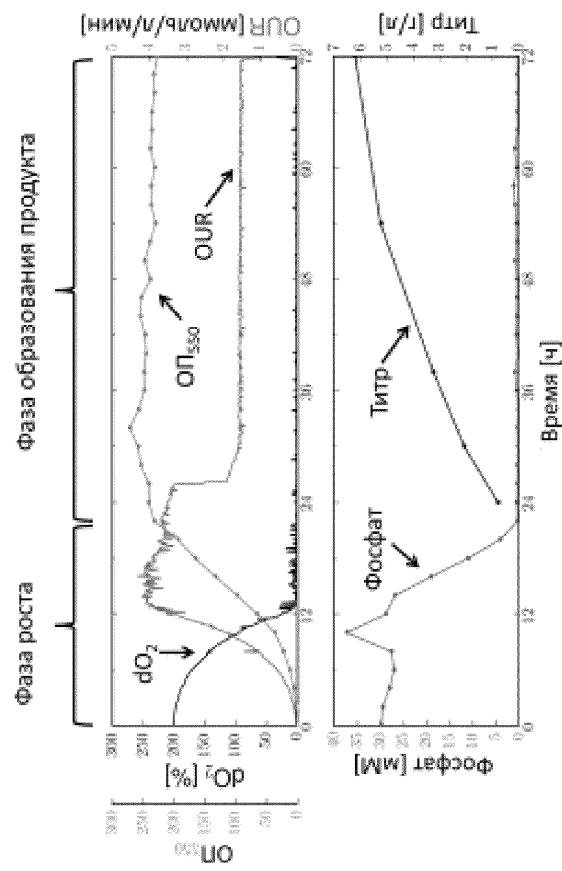
Фиг. 50А

Фиг. 50В

Pho / Pho (TIR = 1, 1)

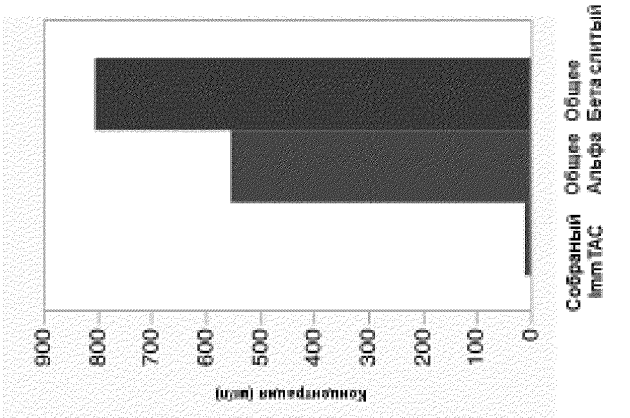


51/66



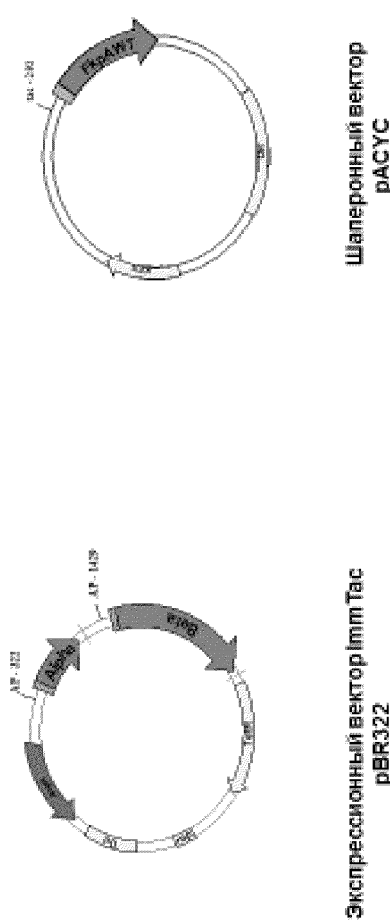
Фиг. 51

52/66



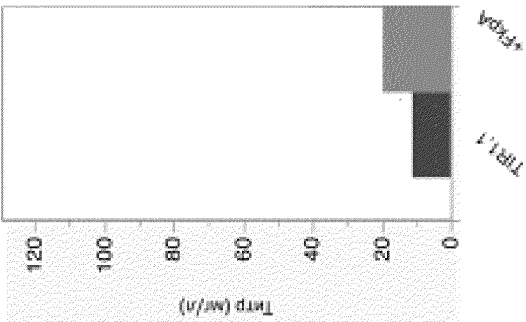
Фиг. 52

53/66

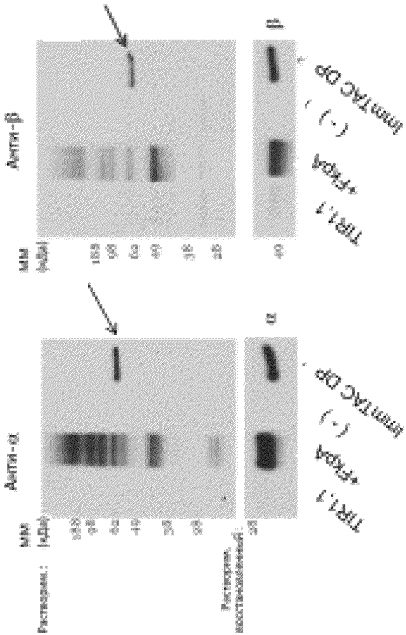


Фиг. 53

54/66

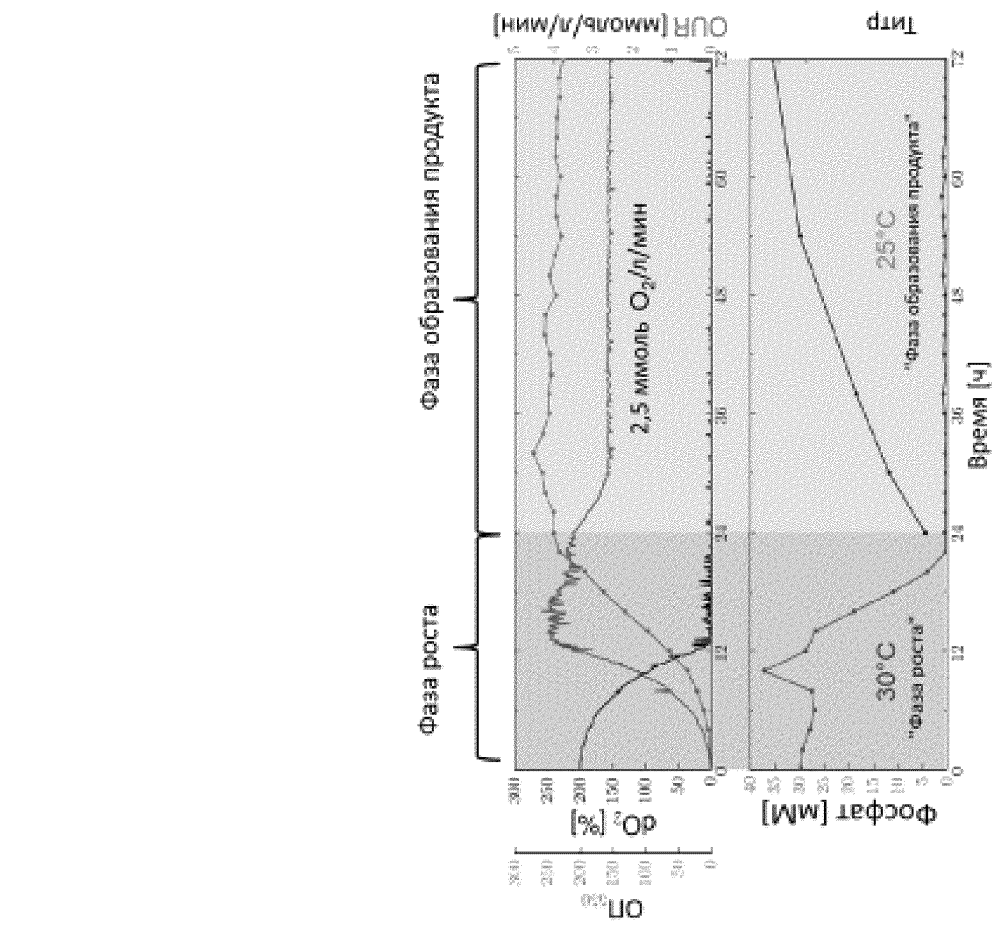


Фиг. 54В



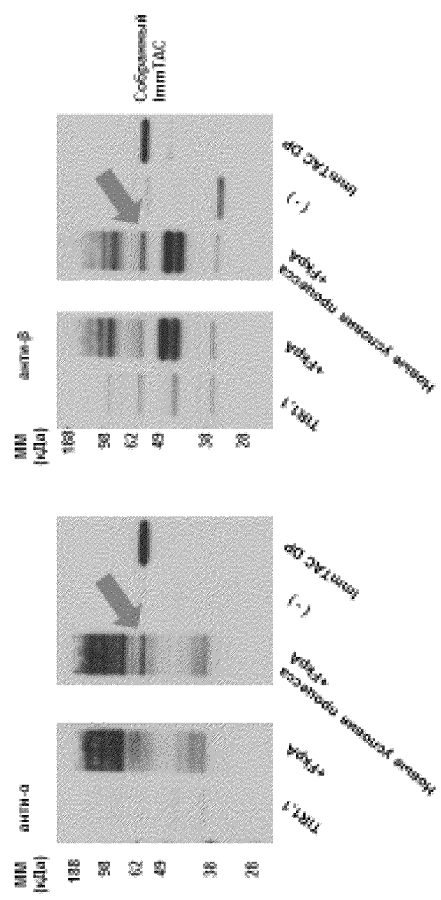
Фиг. 54А

55/66



Фиг. 55

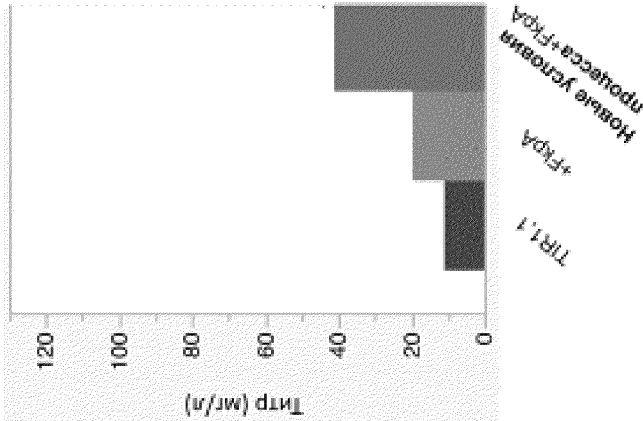
56/66



Фиг. 56В

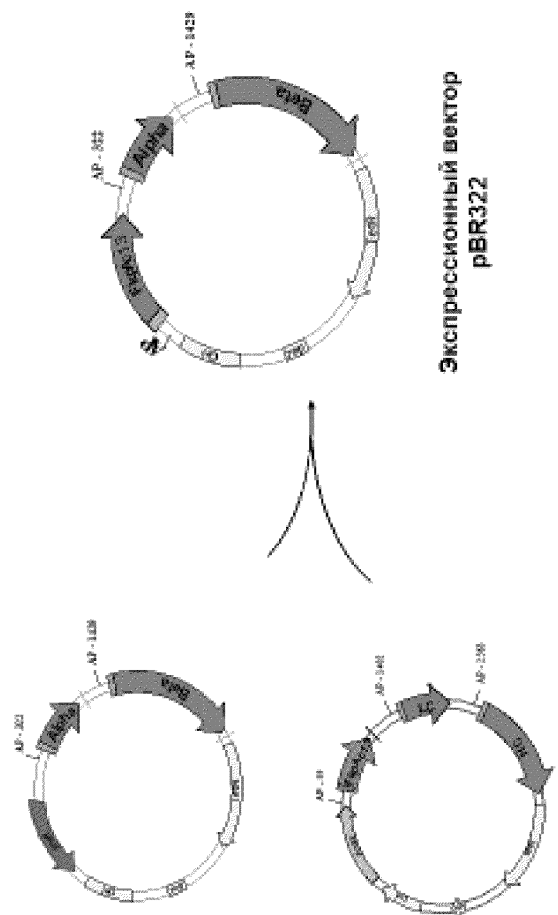
Фиг. 56А

57/66



Фиг. 57

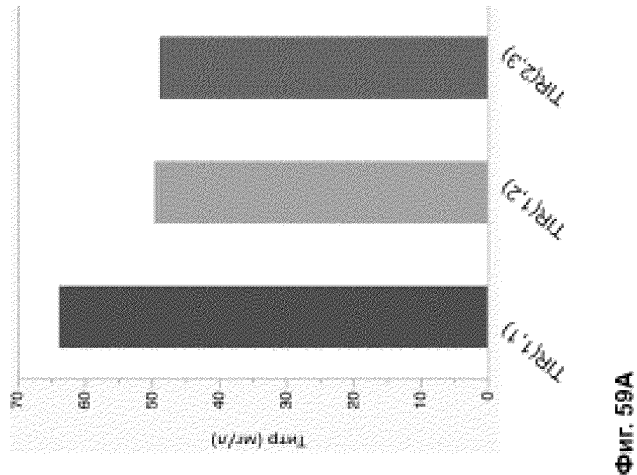
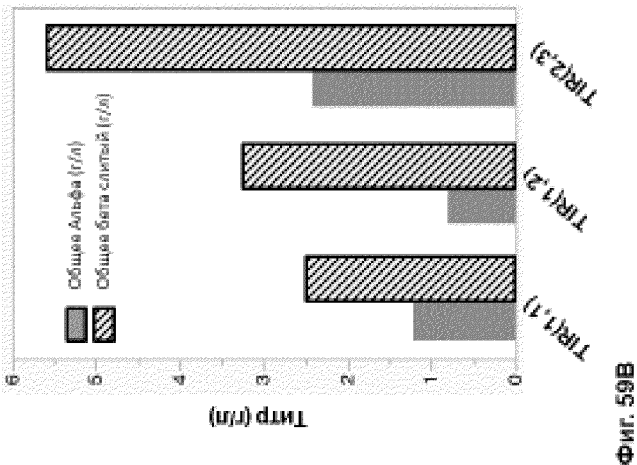
58/66



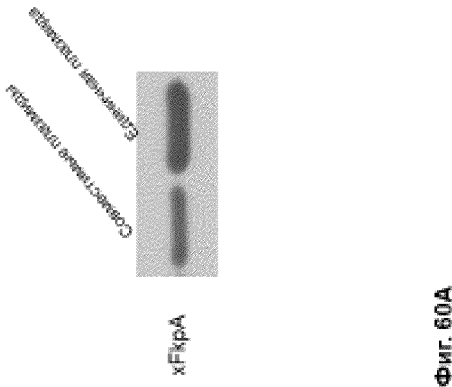
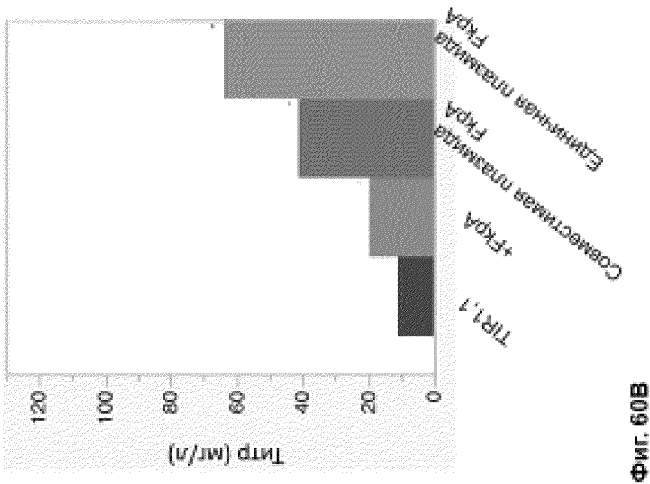
Экспрессионный вектор
pBR322

Фиг. 58

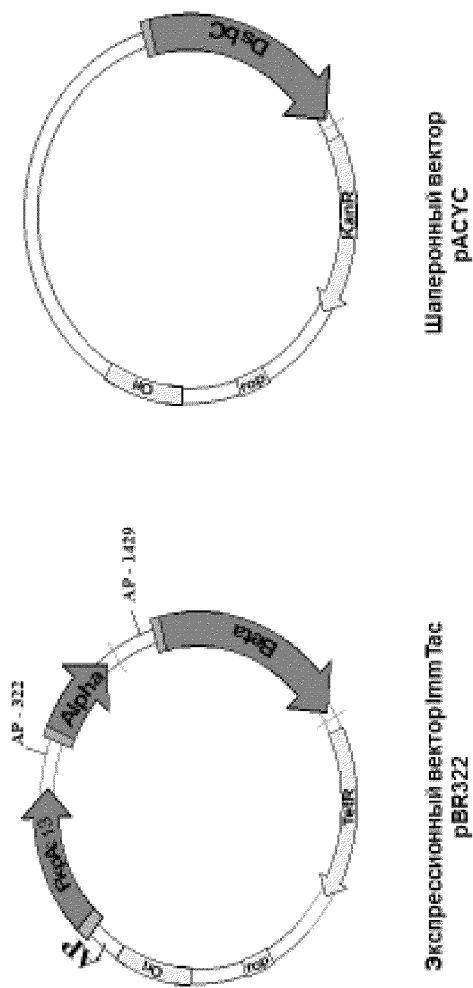
59/66



60/66

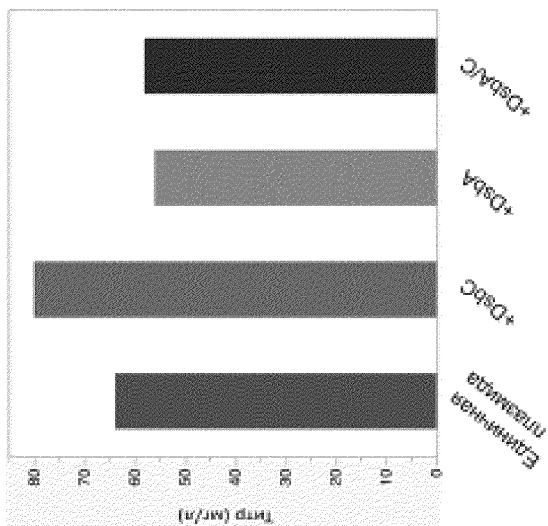


61/66



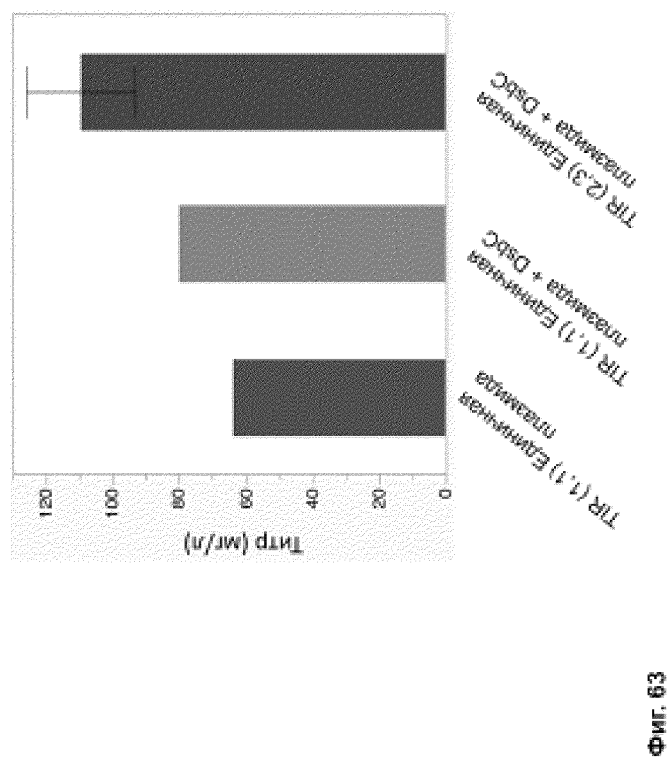
Фиг. 61

62/66



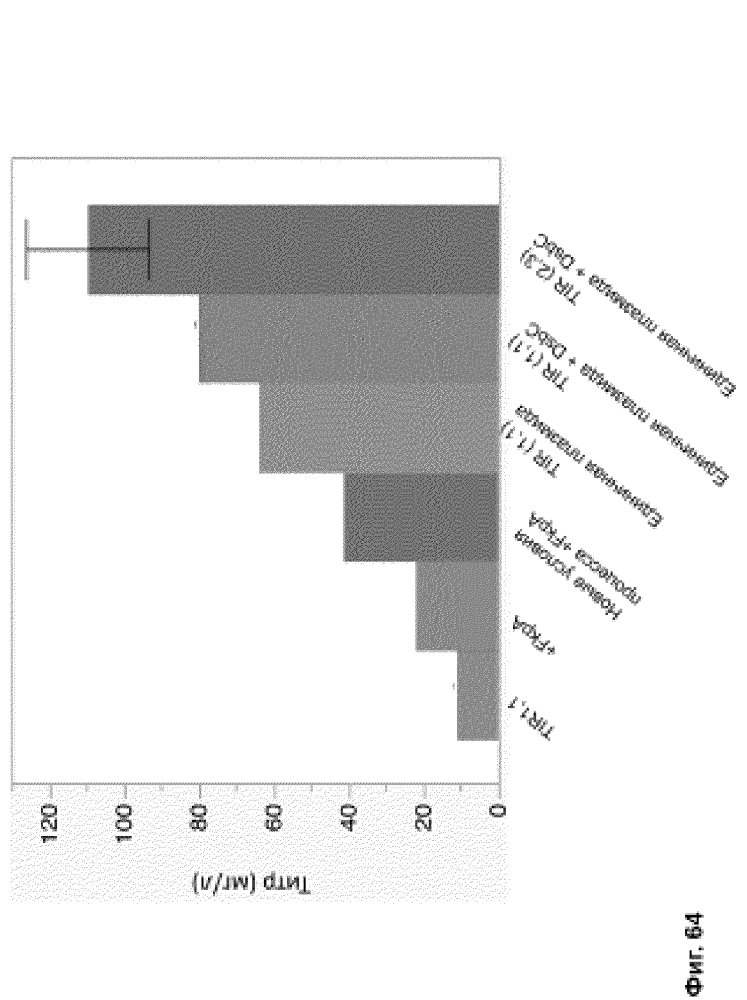
Фиг. 62

63/66



Фиг. 63

64/66



Фиг. 64

65/66

